

# VASKULARNA REAKTIVNOST OTPORNIČKIH KRVNIH ŽILA POTKOŽNOG I VISCERALNOG MASNOG TKIVA U LJUDSKOJ PRETILOSTI

---

Jukić, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:203277>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-30**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE J.J.STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Grizelj

**VASKULARNA REAKTIVNOST OTPORNIČKIH KRVNIH ŽILA POTKOŽNOG I  
VISCERALNOG MASNOG TKIVA U LJUDSKOJ PRETILOSTI**

Doktorski rad

Osijek, 2014.

Mentorica: **prof.dr.sc. Ines Drenjančević, dr.med.**

Komentor: **prof.dr.sc. Shane A. Phillips**

Rad ima 91 stranicu.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Opći pregled vaskulature .....	1
1.1.1. Uloga otporničkih arterija u krvnoj cirkulaciji .....	1
1.1.2. Fiziologija endotela .....	1
1.1.3. Regulacija vaskularnog tonusa pomoću endotela .....	3
1.2. MEHANIZAM PROTOKOM POTAKNUTE DILATACIJE (FID) .....	9
1.2.1. Interakcija između mehanizma vazodilatacije dušikovog oksida i slobodnih kisikovih radikala .....	10
1.3. MEHANIZAM ACETILKOLINOM POTAKNUTE DILATACIJE (AChID) .....	10
1.4. ENDOTELNA DISFUNKCIJA (ED) .....	11
1.4.1. Oksidativni stres i proizvodnja slobodnih kisikovih radikala .....	12
1.5. PRETILOST OPĆENITO .....	13
1.5.1. Masno tkivo, adipokini i vaskularni endotel .....	14
1.5.2. Metabolički zdrava pretilost .....	17
1.6. VISCERALNO I POTKOŽNO MASNO TKIIVO .....	17
1.6.1. Pretilost i endotelna disfunkcija .....	18
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	<b>22</b>
<b>3. CILJEVI</b> .....	<b>23</b>
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>24</b>
4.1. Populacija ispitanika .....	24
4.2. Antropometrijska i metabolička mjerenja .....	24
4.3. Prikupljanje uzoraka .....	24
4.4. Pripremanje uzoraka i protokol fiziološkog pokusa .....	25
4.5. Određivanje stanične proizvodnje NO-a i H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> metodom imunofluorescencije .....	26
4.6. Materijali .....	26
4.7. Statistička analiza .....	27
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>28</b>
5.1. Karakteristike ispitanika .....	28
5.2. Bazični odgovor potkožnih i visceralnih otporničkih arteriola na protokom i acetilkolinom potaknutu dilataciju .....	29
5.3. Učinak inhibicije NO sintetaze i ciklooksigenaze na protokom posredovanu dilataciju otporničkih arterija potkožnog i visceralnog masnog tkiva .....	31

5.4. Učinak inhibicije NO sintetaze i ciklooksigenaze na acetilkolinom posredovanu dilataciju otporničkih arterija potkožnog i visceralnog masnog tkiva.....	33
5.5. Učinak PEG-katalaze na acetilkolinom potaknutu dilataciju otporničkih arteriola potkožnog i visceralnog masnog tkiva .....	37
5.6. Učinak inhibicije metabolizma citokroma P450 i učinak PEG-katalaze na protokom potaknutu dilataciju otporničkih arteriola potkožnog i visceralnog masnog tkiva.....	39
5.7. Određivanje stanične proizvodnje NO-a i H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> u otporničkim arteriolama potkožnog i visceralnog masnog tkiva .....	43
5.8. O endotelu neovisna dilatacija otporničkih arteriola potkožnog (SAT) i visceralnog (VAT) masnog tkiva u odgovoru na natrijev nitroprusid (SNP) .....	47
<b>6. RASPRAVA.....</b>	<b>48</b>
6.1. Odnos visceralnog masnog tkiva i endotelne disfunkcije.....	48
6.2. Mehanizmi vazodilatacije u masnom tkivu.....	50
6.2.1. Uloga metabolita arahidonske kiseline u vaskularnom odgovoru krvnih žila masnog tkiva .....	51
6.2.2. Uloga slobodnih kisikovih radikala u vaskularnom odgovoru krvnih žila masnog tkiva .....	52
6.3. Ograničenja studije.....	55
6.4. Klinički značaj studije.....	55
<b>7. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>57</b>
<b>8. SAŽETAK .....</b>	<b>58</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>60</b>
<b>10. LITERATURA .....</b>	<b>62</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>81</b>

## Kratice

**AA** - arahidonska kiselina (engl. arachidonic acid)

**ACh** – acetilkolin

**AChID** – acetilkolinom potaknuta dilatacija (engl. acetylcholine-induced dilation)

**ADP** – adenzin difosfat

**ATP** – adenzin trifosfat

**BH<sub>4</sub>** – tetrahidrobiopterin

**CaM** – kalmodulin

**cAMP** – ciklički adenzin monofosfat

**CAT** – katalaza

**cGMP** – ciklički gvanozin monofosfat

**COX** – enzim ciklooksigenaza

**COX-1** – enzim ciklooksigenaza-1

**COX-2** – enzim ciklooksigenaza-2

**CRP** – C reaktivni protein

**CYP P450** – citokrom P450

**DBP** – dijastolički arterijski tlak

**DHETE** - dihidroksieikozatrienoična kiselina (engl. dihydroxyeicosatetraenoic acids)

**ED** – endotelna disfunkcija

**EDCFs** – endotelni čimbenici kontrakcije (engl. endothelium-derived contracting factors)

**EDHFs** – endotelni čimbenici hiperpolarizacije (engl. endothelium-derived hyperpolarizing factors)

**EDRFs** - endotelni čimbenici relaksacije (engl. endothelium-derived relaxing factors)

**EETs** – epoksieikozatrienoična kiselina (engl. epoxyeicosatrienoic acid)

**eNOS** – endotelna dušik-oxid sintetaza (engl. endothelial nitric-oxide synthase)

**ET-1** – endotelin-1

**FAD** – flavin adenin dinukleotid

**FID** – protokom potaknuta dilatacija (engl. flow-induced dilation)

**FMN** – flavin mononukleotid

**GSH-Px** – glutation peroksidaza

**GTP** – gvanozin trifosfat

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – vodikov peroksid

**HDL** – lipoprotein visoke gustoće (engl. high-density lipoprotein)

**HETEs** – hidroksieikozatrienoična kiselina (engl. hydroxyeicosatetraenoic acids)

**IL** – interleukin

**INDO** – indometacin

**ITM** – indeks tjelesne mase

**LDL** – lipoprotein niske gustoće (engl. low-density lipoprotein)

**L-NAME** – N-nitro-L-arginine metil ester

**LO** – lipooksigenaza

**MAP** – srednji arterijski tlak (engl. mean arterial pressure)

**NADPH** – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**NO** – dušikov oksid (engl. nitric oxide)

**NOS** – dušik-oksidi sintetaza (engl. nitric-oxide synthase)

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - superoksidni anion

**ONOO<sup>-</sup>** - peroksinitrit

**PAP**- papaverin

**PEG-CAT** – polietilenglikol katalaza

**PGH<sub>2</sub>** – prostaglandin H<sub>2</sub>

**PGI<sub>2</sub>** – prostaglandin I<sub>2</sub> (prostaciklin)

**PLA<sub>2</sub>** - fosfolipaza A<sub>2</sub>

**ROS** – slobodni kisikovi radikali (engl. reactive oxygen species)

**SAT** – potkožno masno tkivo (engl. subcutaneous adipose tissue)

**SBP**- sistolički arterijski tlak

**sEH** – solubilna epoksidna hidolaza

**sGC** – solubilna gvanilil ciklaza

**SNP** – natrijev nitroprusid (engl. sodium-nitroprusside)

**SOD**- superoksid dismutaza

**TNF $\alpha$**  – tumor nekrotizirajući faktor  $\alpha$

**TXA<sub>2</sub>** – tromboksan A<sub>2</sub>

**VAT** – visceralno masno tkivo (engl. visceral adipose tissue)

**VSMC** - stanice glatkog mišićja (engl. vascular smooth muscle cells)

**XO** – ksantin-oksidaza



**17-ODYA** – engl. 17-octadecynoic acid

## **Popis tablica**

**Tablica 1.** Antropometrijske, biokemijske i hemodinamske mjere ispitanika (28. stranica)

## Popis slika

**Slika 1.** Bazični odgovor otporničkih arteriola potkožnog (SAT) i visceralnog (VAT) masnog tkiva na protokom potaknutu dilataciju (FID) (29. stranica)

**Slika 2.** Bazični odgovor otporničkih arteriola potkožnog (SAT) i visceralnog (VAT) masnog tkiva na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID) (30. stranica)

**Slika 3.** Učinak inhibicije NO sintetaze (NOS) i ciklooksigenaze (COX) na protkom posredovanu dilataciju (FID) otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva (SAT) (31. stranica)

**Slika 4.** Učinak inhibicije NO sintetaze (NOS) i ciklooksigenaze (COX) na protkom posredovanu dilataciju (FID) otporničkih arterija visceralnog masnog tkiva (VAT) (32. stranica)

**Slika 5.** Učinak inhibicije NO sintetaze (NOS) na protkom posredovanu dilataciju (AChID) otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva (SAT) (33. stranica)

**Slika 6.** Učinak inhibicije ciklooksigenaze (COX) na acetilkolinom posredovanu dilataciju (AChID) otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva (SAT) (34. stranica)

**Slika 7.** Učinak inhibicije NO sintetaze (NOS) na acetilkolinom posredovanu dilataciju (AChID) otporničkih arterija visceralnog masnog tkiva (VAT) (35. stranica)

**Slika 8.** Učinak inhibicije ciklooksigenaze (COX) na acetilkolinom posredovanu dilataciju (AChID) otporničkih arterija visceralnog masnog tkiva (VAT) (36. stranica)

**Slika 9.** Učinak polietilenglikol katalaze (PEG-CAT) na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID) otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva (SAT) (37. stranica)

**Slika 10.** Učinak polietilenglikol katalaze (PEG-CAT) na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID) otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva (VAT) (38. stranica)

**Slika 11.** Učinak inhibicije metabolizma citokroma P450 na protokom potaknutu dilataciju (FID) otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva (SAT) (39. stranica)

**Slika 12.** Učinak polietilenglikol katalaze (PEG-CAT) na protokom potaknutu dilataciju (FID) otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva (SAT) (40. stranica)

**Slika 13.** Učinak inhibicije metabolizma citokroma P450 na protokom potaknutu dilataciju (FID) otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva (VAT) (41. stranica)

**Slika 14.** Učinak polietilenglikol katalaze (PEG-CAT) na protokom potaknutu dilataciju (FID) otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva (VAT) (42. stranica)

**Slika 15A,B.** Proizvodnja dušikovog oksida (NO) u otporničkim arteriolama visceralnog (VAT) i potkožnog (SAT) masnog tkiva u prisutnosti i odsutnosti protoka, prije i nakon inkubacije s L-NAME-om (43. i 44. stranica)

**Slika 16A,B.** Proizvodnja vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) u otporničkim arteriolama visceralnog i potkožnog masnog tkiva u prisutnosti i odsutnosti protoka, prije i nakon inkubacije s PEG-katalazom (45. i 46. stranica)

**Slika 17.** O endotelu neovisna dilatacija otporničkih arteriola potkožnog (SAT) i visceralnog (VAT) masnog tkiva u odgovoru na natrijev nitroprusid (SNP) (47. stranica)

## **1. UVOD**

### **1.1. Opći pregled vaskulature**

#### **1.1.1. Uloga otporničkih arterija u krvnoj cirkulaciji**

Jedna od glavnih uloga kardiovaskularnog sustava je osigurati zadovoljavajući protok krvi kroz različita tkiva i organe, kako bi onda oni mogli održavati svoj vlastiti lokalni protok s obzirom na njihove metaboličke potrebe. Otporničke krvne žile predstavljaju glavni izvršni organ kardiovaskularnog sustava koji je primarno odgovoran za regulaciju lokalnog krvnog protoka. Upravo te krvne žile pružaju najveći otpor krvnom protoku te imaju ključnu ulogu u održavanju sistemskog krvnog tlaka. Poremećaji perifernog otpora su glavni uzročnici različitih kardiovaskularnih patoloških stanja. Stijenka krvnih žila je građena od endotelnih stanica te stanica glatkog mišićja (VSMC). Endotel odvaja krv od okolnog tkiva i neizravno utječe na aktivnost stanica glatkog mišićja otpuštajući različite vazoaktivne posrednike, koji mogu dovesti do promjena promjera krvnih žila (1).

#### **1.1.2. Fiziologija endotela**

Iako je nekad smatran jednostavnom preprekom između krvi i stijenke krvne žile, danas se zna da je endotel dinamičan organ koji oblaže čitav vaskularni sustav. Endotel je svojom strukturom jednostavan, ali raspodjelom gotovo sveprisutan organ, prosječne težine oko jednoga kilograma. Ukupni broj od 1 do  $6 \times 10^{13}$  endotelnih stanica u sloju debljine 0.5 do 1  $\mu\text{m}$  prekriva unutarnje stijenke svih cirkulacijskih šupljina površine od 4000 do 7000  $\text{m}^2$ . Riječ je o heterogenoj epitelnoj strukturi visoke biološke dinamike i raznovrsnih metaboličkih aktivnosti s posebno naglašenim sposobnostima prilagodbe (2,3).

Endotelne su stanice vrlo dinamične i imaju metaboličku i sintetsku ulogu. One imaju značajnu autokrinu, parakrinu i endokrinu ulogu, te utječu na funkciju stanica glatkog mišićja, krvnih žila, trombocita i leukocita. Endotel kontrolira: vaskularnu permeabilnost, izmjenu molekula u odgovoru na molekularne signale, vaskularnu funkciju u odgovoru na različite

hormone, neuroprijenosnike i vazoaktivne faktore koji zahvaćaju vazomociju, trombozu, agregaciju trombocita i upalu (2,4).

### **Endotelni metabolizam i djelovanje arahidonske kiseline**

Masna kiselina, arahidonska kiselina (AA), je glavni sastavni dio stanične membrane koji se otpušta iz fosfolipida stanične membrane primarno djelovanjem fosfolipaze A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Poticanje vaskularnih endotelnih stanica agonistima, kao što je acetilkolin (ACh), ili silom smicanja (eng. shear stress), aktivira se fosfolipaza i dolazi do otpuštanja AA. Arahidonska kiselina može biti metabolizirana putem nekoliko enzimatskih sustava ili može biti neenzimatskim putem pretvorena u radikal (5).

Endotelne stanice metaboliziraju arahidonsku kiselinu uz pomoć 3 enzimatska sustava: ciklooksigenaze (COX), lipooksigenaze (LO), te uz pomoć citokroma P450 (CYP P450).

Glavni metaboliti COX puta su prostaciklini PGI<sub>2</sub>. Ciklooksigenaze pretvaraju arahidonsku kiselinu u prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), koji se zatim sintetizira u PGI<sub>2</sub> pomoću prostaciklin sintaze, ili u tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) pomoću tromboksan sintaze. Postoje dvije izoforme ciklooksigenaze, ciklooksigenaza 1 (COX-1) i ciklooksigenaza 2 (COX-2). Obje su izražene u fiziološkim i patološkim uvjetima, ali njihove uloge, razine aktivnosti i afinitet za arahidonsku kiselinu mogu biti različiti (5,6). U većini tkiva COX-1 je temeljno izražena i proizvodi dilatorne prostaglandine, dok se za COX-2 vjeruje da je inducibilni enzim, aktiviran proupalnim čimbenicima, a proizvodi nekoliko prostaglandina dovodeći do upalnog procesa, trombogeneze ili angiogeneze, iako je izražen i u fiziološkim stanjima (7). O COX-u i endotelu ovisna vazokonstrikcija opisana je u različitim vrstama kao odgovor na razne agoniste i čimbenike koji dovode do povećanja koncentracije endotelnog unutarstaničnog kalcija [Ca<sup>2+</sup>] u uvjetima neovisnim o receptoru, kao i u odgovoru na fizički podražaj poput rastezanja. U mnogim kardiovaskularnim bolestima, rasprostranjena masivna vaskularna upala i upala organa povećava proizvodnju eikosanoida i mijenja njihov učinak iz vazodilatacije i antitromboze u vazokonstrikciju, protrombozu i daljnju upalu (8).

Endotel izražava tri glavne LO izoforme: 5-LO, 12-LO i 15-LO. Proizvodi 12-LO i 15-LO posreduju vazodilataciju, dok su leukotrieni nastali uz pomoć 5-LO povezani sa vazokonstrikcijom. 12- i 15-hidroksieikozatrienoična kiselina (HETEs) glavni su LO metaboliti.

Arahidonska se kiselina metabolizira u bubrezima i perifernoj vaskulaturi pomoću citokroma P450 u epoksieikozatrienoične kiseline (EETs) i 20-HETE. EETs predstavljaju vazodilatatore proizvedene pomoću endotela. Oni hiperpolariziraju stanice vaskularnog glatkog mišićja otvarajući  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivirani  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) kanale. 20-HETE je vazokonstriktor koji inhibira otvaranje  $\text{K}_{\text{Ca}}$  kanala u stanicama vaskularnog glatkog mišićja (9). Postoje 4 izomera EETs-a sintetizirana pomoću endotelnih stanica, 14,15-, 11,12-, 8,9- i 5,6-EETs, s time da su 14,15- i 11,12-EETs glavni metaboliti (10). EETs se metaboliziraju pomoću solubilne epoksidne hidrolaze (sEH) u oblik dihidroksieikozatrienoične kiseline (DHETs). EETs i njihovi metaboliti su jedini CYP metaboliti koje proizvodi endotel, a proizvodnja EETs-a nije zabilježena u stanicama glatkog mišićja (11). Suprotno tome, vaskularne stanice glatkog mišićja imaju približno jednu petinu aktivnosti endotelnih stanica u metaboliziranju arahidonske kiseline.

Endotelne stanice izražavaju nekoliko CYP-ova: 4A, 2C i 2J podvrste. CYP4A  $\omega$ -hidroksilaza proizvodi vazokonstriktor 20-HETE, dok CYP2C i CYP2J epoksigenaze proizvode EETs - 5,6-EET, 11,12-EET, ili 14,15-EET, od koji svi uzrokuju vazodilataciju, aktivirajući  $\text{B}_\text{K}$  kanale i uzrokujući hiperpolarizaciju praćenu relaksacijom (12). EETs također olakšavaju endotelnu signalizaciju  $\text{Ca}^{2+}$  i povećavaju autokrinu sintezu dušikovog oksida (NO) (13).

LO i CYP metaboliti arahidonske kiseline predstavljaju difuzibilne endotelnih čimbenika relaksacije (eng. endothelium-derived relaxing factors, EDRF) (11). Mehanizam kojim posreduju vazodilataciju uključuje aktivaciju kalijevih kanala što dovodi do hiperpolarizacije i relaksacije. Zbog njihove sposobnosti hiperpolariziranja i relaksiranja vaskularnih stanica glatkog mišićja, njihova vazodilatorna aktivnost povezuje se s učinkom endotelnih hiperpolarizirajućih čimbenika (eng. endothelium-derived hyperpolarizing factors, EDHF) (12).

### **1.1.3. Regulacija vaskularnog tonusa pomoću endotela**

#### **Vazoaktivni posrednici dilatcije**

Endotel krvnih žila ima ključnu ulogu u održavanju vaskularnog tonusa i promjene su vaskularnog protoka u složenom međudjelovanju s endotelom. Sposobnost izazivanja vazodilatacije u odgovoru na naglu promjenu protoka (žilni stres) jedno je od glavnih svojstava prikladne uloge endotela. Endotel posreduje vazomotorni tonus u odgovoru na razne

kemijske (ACh) ili fizičke (sila smicanja) poticaje, sintetizirajući i otpuštajući različite vazoaktivne posrednike. Oni mogu biti EDRF, kao što je dušikov oksid, prostaciklin (PGI<sub>2</sub>) i endotelni hiperpolarizirajući čimbenik, ili pak endotelni čimbenik kontrakcije (eng. endothelium-derived contracting factors, EDCF) kao što je endotelin (ET-1), tromboksan A<sub>2</sub> i slobodni radikali kisika (eng. reactive oxygen species, ROS) (3,14-16).

a) Dušikov oksid (NO)

NO je najvažniji posrednik koji uzrokuje dilataciju krvnih žila ovisnu o endotelu, a prvi puta su ga opisali Furchgott i Zawadzki. Oni su zabilježili da endotel otpušta vazoaktivnu supstancu kada je podražen acetilkolinom, odnosno otpušta endotelni čimbenik relaksacije (EDRF) (17). Nekoliko godina kasnije, Ignarro i suradnici su prepoznali EDRF kao NO (18), a Ferdi Murad je pokazao da NO uzrokuje opuštanje glatkih mišićnih stanica. Za otkriće dušikovog oksida i njegove uloge u staničnoj signalizaciji ova su tri znanstvenika dobila Nobelovu nagradu za fiziologiju 1998.godine.

NO ima vrlo važnu ulogu u održavanju bazalnog tonusa krvnih žila (19) i ima glavnu ulogu u vazodilataciji (20). Osim ovih ključnih uloga, NO spriječava adheziju i agregaciju trombocita, kao i adheziju i migraciju leukocita u arterijski zid te inhibira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica – svih ključnih događaja u razvoju ateroskleroze (21). Proizvodnja dušikovog oksida je upravljana i oblikovana pomoću nekoliko fizioloških i patoloških mehanizama; glavni čimbenik koji uzrokuje proizvodnju NO-a je sila smicanja, ali također postoje mnogi drugi čimbenici koji potiču njegovu sintezu, kao što su acetilkolin, bradikinin, trombin, adenzin difosfat (ADP), adenzin trifosfat (ATP), dovodeći do opuštanja vaskularnih stanica glatkog mišićja (17,19-23).

Krv u lumenu krvne žile djeluje na stijenku dvjema ortogonalnim silama. Tangencijelno usmjerena sila na jedinicu površine stijenke, primarno povezana s protokom, frikcijska je sila poznata kao sila smicanja ili „*shear stress*“. Druga je sila izravna sila istezanja koja na stijenku djeluje okomito i izravno te odgovara krvnom tlaku. Na tangencijalnu deformaciju pod smicajnim utjecajem endotelne strukture odgovaraju gotovo trenutačnim promjenama u staničnim membranama, reorganizacijom unutarnje strukture i programiranim usmjeravanjem niza biokemijskih procesa. Upravo je sila smicanja najvažniji fiziološki čimbenik koji potiče proizvodnju dušikovog oksida, fosforilacijom endotelne NO sintetaze (eNOS) kao i stimulacijom endotelnih staničnih receptora (24). Točnije, sila



smicanja aktivira  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivirane  $\text{K}^+$  kanale na površini endotelnih stanica dovodeći do izlaska  $\text{K}^+$ , a utoka  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu. Doprinos  $\text{Ca}^{2+}$  i fosforilacije eNOS-a proizvodnji dušikovog oksida ovisi o trajanju sile smicanja; unutarstanično otpuštanje  $\text{Ca}^{2+}$  događa se kod kratkog trajanja sile smicanja, dok sila smicanja koja traje dulje (više od 30 minuta) može potrošiti unutarstanične zalihe  $\text{Ca}^{2+}$  pa proizvodnja dušikovog oksida ovisi o fosforilaciji eNOS-a (25-28).

Međusobni je odnos endotelnih stanica i sile smicanja ključan za održavanje vaskularne homeostaze. Endotelne stanice iskazuju sposobnost pretvaranja mehaničkih sila u biološke reakcije – rastezanje žilne stijenke bilježe mehanoreceptori koji zatim potiču niz pojedinačnih događaja. Endotelne stanice odgovaraju na hemodinamske i hormonalne podražaje, povezuju ih s prijenosom signala kao i ekspresijom gena i proteina i otpuštaju vazoaktivne čimebnike koji oblikuju propusnost membrane, adheziju leukocita i apoptozu. Abnormalni odgovor endotelnih stanica na protok, odnosno silu smicanja, doprinosi nastanku vaskularne patologije, posebice u ranim fazama ateroskleroze (25).

Različite vrste protoka određuju morfologiju endotelnih stanica, metabolizam i upalni fenotip, prijenosom signala te genske i proteinske ekspresije. Tako visoko laminaran *shear stress* ima ključnu ulogu u prevenciji ateroskleroze održavanjem vaskularnog tonusa i integriteta i endotelnih stanica, dok u krvnim žilama niskom ili oscilatornog *shear stressa* događaji, poput povećane adhezije leukocita i povećane proizvodnje slobodnih kisikovih radikala, doprinose razvoju ateroskleroze (26).

NO se sintetizira iz L-arginina u prisutnosti  $\text{O}_2$  i NADPH (29) pomoću NO sintetaze (NOS), koja se javlja u tri izoformna oblika: neuronalna NOS (nNOS, NOS I) je primarno smještena u citosolu živčanih stanica središnjeg i perifernog živčanog sustava; inducibilna NOS (iNOS, NOS II), uglavnom ih sintetiziraju makrofazi i leukociti, aktivirani vanjskim čimbenicima kao što su medijatori upale i različiti citokini; i endotelna NOS (eNOS, NOS III) prvenstveno je smještena na membrani endotelnih stanica krvnih žila. nNOS i eNOS su konstitutivne i normalno su prisutne u stanicama i neprekidno proizvode NO u malim količinama (nmol), a njihova aktivnost ovisi o promjeni koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  - povećanje unutarstanične koncentracije, kao odgovor na podražaje određenim agonistima, odnosno djelovanjem sila smicanja protoka krvi, trenutno potiču stvaranje NO-a. Aktivnost iNOS-a neovisna je o promjenama unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , a vanjski čimbenik potiče njegovu izražajnost i tako inducirani enzim u citosolu stanica proizvodi velike količine NO-a ( $\mu\text{mol}$ ), koje mogu djelovati citotoksično (16,30,31).

eNOS je dimer koji se sastoji od dva istovjetna monomera; C-kraj koji je reduktazna domena i N-kraj koji je oksigenazna domena. Reduktazna strana ima vezna mjesta za redoks kofaktore nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD), te za kalmodulin (CaM). Kalmodulin aktivira NOS uglavnom zahvaćajući reduktaznu domenu. N-kraj ima vezno mjesto za hem  $\text{Fe}^{2+}$ , za tetrabiopterin ( $\text{BH}_4$ ) i za L-arginin (32). NOS katalizira reakciju u dva koraka i pretvara L-arginin  $N^{\circ}$ -hydroxy-L-arginine u konačni proizvod, NO i citrulin. Smanjena biodostupnost kofaktora poput hem  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{BH}_4$  i L-arginina dovodi do poremećene funkcije eNOS-a (33,34).

Inaktivna eNOS je smještena u malim uvrnućima membrane koji se nazivaju kaveole, vezane za protein kaveolin od kojih se odvaja te postaje aktivna kada se poveća koncentracija unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  (35). Kada se iscrpe zalihe  $\text{Ca}^{2+}$ , šalje se signal membranskim receptorima za otvaranje  $\text{Ca}^{2+}$ kanala dopuštajući utok vanstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu (36).  $\text{Ca}^{2+}$  se veže za protein kalmodulin u staničnoj citoplazmi i nakon strukturnih promjena veže se za eNOS, koji pretvara L-arginin u NO (29). Proizvodnja NO-a ovisi o razini unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  kao i o količini  $\text{Ca}^{2+}$  koji ulazi u stanicu iz vanstaničnog prostora.

Nakon što se sintetizira, NO difundira kroz endotelnu stanicu u okolnu mišićnu stanicu te se veže sa enzim gvanilil-ciklazu (sGC) (37). Sada aktivirani enzim povećava pretvorbu gvanozin trifosfata (GTP) u ciklički gvanozin monofosfat (cGMP) koji potiče kaskadu biokemijskih reakcija čiji je krajnji rezultat smanjenje ulaska iona kalcija u stanicu, te smanjenja kontrakcija glatkog mišićja (37,38).

#### *b) Prostaciklin $\text{PGI}_2$*

$\text{PGI}_2$  je drugi bitan EDRF koji se djelomično otpušta u odgovoru na žilni stres (39,40). Sintetizira ga enzim ciklooksigenaza-1 iz arahidonske kiseline (11), a djeluje tako da povišuje koncentraciju cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) u glatkim mišićnim stanicama i u trombocitima, čime dovodi do opuštanja glatkog mišićja i inhibicije agregacije trombocita (5).

Poput NO-a,  $\text{PGI}_2$  je središnji kardioprotektivni hormon koji inhibira aktivaciju trombocita, smanjuje rizik nastanka tromboze kao i remodeliranje vaskularnog glatkog mišićja, te uzrokuje vazodilataciju (41,42). Njegov je učinak suprotan učinku tromboksana koji uzrokuje aktivaciju trombocita, vazokonstrikciju i proliferaciju mišićnih stanica. Zbog značajne uloge u kardiovaskularnom sustavu, smatra se da treba biti u ravnoteži s  $\text{TXA}_2$ .

Učinak prostaciklina je čvrsto vezan s učinkom NO-a; PGI<sub>2</sub> olakšava otpuštanje NO-a iz endotelnih stanica, i suprotno, djelovanje PGI<sub>2</sub> u vaskularnim mišićnim stanicama je također potencirano dušikovim oksidom (43).

Za razliku od NO-a, PGI<sub>2</sub> ne doprinosi održavanju bazalnog vaskularnog tonusa velikih provodnih krvnih žila, nego se otpušta na poticaj različitih agonista (44,45).

### *c) Endotelni hiperpolarizirajući čimbenici (EDHF)*

Osim NO i PGI<sub>2</sub>, postoje dodatni endotelni posrednici koji su uključeni u o endotelu ovisnu regulaciju tonusa glatkog mišićja, koji hiperpolariziraju okolne mišićne stanice čineći membranski potencijal negativnijim, a nazivaju se endotelni hiperpolarizirajući čimbenici. U mnogim krvnim prostorima o protoku i agonistu ovisna vazodilatacija nije regulirana putem NO-a ili PGI<sub>2</sub>, već aktivacijom o Ca<sup>2+</sup> ovisnim K<sup>+</sup> (K<sup>+</sup><sub>Ca</sub>) kanalima. Aktivacija endotelnih receptora i posljedični porast koncentracije unutarstaničnog kalcija uzrokuje otvaranje kalcijem aktiviranih kalijevih kanala i hiperpolarizaciju endotelnih stanica. Mišićne stanice odgovaraju na promjene razine izvanstaničnog kalija i također otpuštaju kalij izvan mišićne stanice uzrokujući hiperpolarizaciju. Promjene membranskog potencijala glatke mišićne stanice smanjuju unutarstaničnu razinu Ca<sup>2+</sup>, što uzrokuje relaksaciju (12,46).

Brojne su studije objašnjavale mehanizam kojim djeluju EDHF, međutim trenutno postoje tri objašnjenja. Prvi je od njih povezan s aktivacijom enzima citokroma P450 i proizvodnjom hiperpolarizirajućih metabolita arahidonske kiseline (EETs), koji ili potiču hiperpolarizaciju endotelne stanice ili su otpušteni iz endotelnih stanica kako bi poticali K<sup>+</sup><sub>Ca</sub> kanale stanica vaskularnog glatkog mišićja (47,48). Drugi mehanizam uključuje otpuštanje K<sup>+</sup> iona kroz aktivirane endotelne K<sup>+</sup><sub>Ca</sub> kanale, aktivaciju K<sup>+</sup> kanala ili Na-K-ATPaze, dovodeći do hiperpolarizacije VSMCs (49). Treći stanični mehanizam, za kojeg se smatra da ima značajnu ulogu u arterijama veličine otporničkih arterija (50), uključuje prijenos hiperpolarizirajućeg signala iz endotelnih stanica u VSMC kroz mio-endotelnu pukotinu (51,52).

Humane studije (53), kao i one rađene na izoliranim žilama (54,55), su opisale vazodilataciju koja nije ovisna niti o NO niti o PGI<sub>2</sub>, a koja može biti oslabljena pomoću inhibitora citokroma P450. Ovaj je odgovor posebno izražen u arterijama koje pokazuju endotelnu disfunkciju (umanjen NO-om posredovan vazodilatatorni odgovor na acetilkolin ili povećan protok), što dovodi do zaključka da bi EDHFs mogli biti kompenzatorni mehanizmi

o endotelu ovisne vazodilatacije u stanjima smanjene proizvodnje ili biodostupnosti NO-a (56).

Brojne su studije definirale nekoliko molekula ili posrednika koji djeluju kao EDHF u različitim vrstama i tkivima:  $K^+$ , metaboliti citokroma P450 (EETs), produkti lipooksigenaze, sam NO, slobodni radikali kisika ( $H_2O_2$ ), cAMP, natriuretski peptid tip C (11,57-61).

PGI<sub>2</sub>, NO, i EDHF imaju zajedničku ulogu: dilataciju krvnih žila u odgovoru na agoniste, kao što je acetilkolin i bradikinin, i fizičku silu, kao što je protok i žilni stres. Oni djeluju suprotno od vazokonstriktora i održavaju protok krvi kroz organe.

### **Vazoaktivni posrednici konstrikcije**

#### *a) Endotelin i b) Tromboksan*

Nekoliko godina nakon otkrića NO-a, otkriven je vazokonstriktorni peptid kojeg proizvodi vaskularni endotel, endotelin (ET) (62,63). Postoje tri vrste endotelina, no vaskularne endotelne stanice proizvode samo endotelin-1 (64), koji potiče proliferaciju stanica. Međusobna ukrižena veza između endotelina, NO-a i prostaciklina kontrolira vaskularni tonus krvnih žila (2). ET-1 predstavlja najpotentniji endotelni čimbenik konstrikcije i djeluje kao fiziološka protuteža djelovanju NO-a (65). Nekoliko čimbenika utječe na proizvodnju i otpuštanje ET-1, među kojima su žilni stres, angiotenzin II, trombin, adrenalin, oksidirani lipoprotein male gustoće i upalni citokini (66-69). Kod ljudi ET-1 povišuje krvni tlak i dovodi do vaskularne i miokardijalne hipertrofije, što su važni rizični čimbenici kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (70).

Drugi je važan EDCF tromboksan (TXA<sub>2</sub>), koji sintetiziraju COX-1 i tromboksan sintetaza u metabolizmu arahidonske kiseline. Povećana proizvodnja tromboksana dovodi do vazokonstrikcije i agregacije trombocita povećavajući rizik od kardiovaskularnih incidenata (4,7).

Prikazana složenost sustava vazoaktivnih tvari žilne stijenke, usprkos mnogobrojnim otvorenim pitanjima, ističe njihovu neupitnu ulogu u održavanju fiziološke ravnoteže i funkcije krvnih žila.

## 1.2. MEHANIZAM PROTOKOM POTAKNUTE DILATACIJE (FID)

Protokom potaknuta dilatacija je važan fiziološki poticaj regulacije vaskularnog tonusa i homeostaze periferne cirkulacije. Ovaj se važan endotelni mehanizam vazodilatacije događa zapravo u svojoj vaskulaturi pomoću otpuštanja endotelnih vazoaktivnih posrednika (44,71). U uvjetima stalnog promjera krvne žile, povećanje protoka dovodi do povećanja žilnog stresa (72). U nekoliko je pokusa pokazano kako se povećanjem krvnog protoka povećava i promjer krvne žile (protokom potaknuta dilatacija) samo kod arteriola s očuvanim endotelom (73-75).

Istraživanja na životinjama su izvijestila o tome kako je u stanju povećanog oksidativnog stresa smanjen doprinos dušikovog oksida u mehanizmu protokom posredovane dilatacije (FID) (73). Kod ljudi, in vivo i in vitro istraživanja su pokazala da neki drugi faktor vazodilatacije, osim NO-a, kompenzira održavanje FID-a kod smanjene biodostupnosti NO-a (76). Promjenjena protokom potaknuta dilatacija je znak razvoja kardiovaskularnih bolesti i početni je događaj u razvoju aterosklerotske srčane bolesti (77). U koronarnoj arterijskoj bolesti arteriole izražavaju izmijenjene o endotelu ovisne fiziološke i farmakološke odgovore. Kuo i suradnici su u svojem istraživanju pokazali abnormalan o endotelu ovisan odgovor na djelovanje agonista, kao i oslabljenu protokom posredovanu vazodilataciju arteriola kod životinjskih modela aterosklerotske koronarne bolesti (78). Kod ljudi, Phillips i suradnici su pokazali kako vodikov peroksid,  $H_2O_2$ , zamijenjuje dušikov oksid kao posrednik o endotelu ovisne protokom potaknute dilatacije u otporničkim arterijama visceralnog masnog tkiva u prisutnosti koronarne arterijske bolesti (79). Nedavna su istraživanja u istome laboratoriju pokazala kako protok potiče proizvodnju  $H_2O_2$  u izoliranim otporničkim arterijama kod ljudi bez poznate kardiovaskularne bolesti (80). Miura i suradnici su dokazali kako žilni stres dovodi do povećanja endotelnog otpuštanja  $H_2O_2$ , što je sukladno mišljenju da je  $H_2O_2$  EDHF koji doprinosi procesu protokom potaknute dilatacije koronarnih arterija kod pacijenata s poznatom srčanom bolesti (81). Razna istraživanja upućuju na to kako bi porast oksidativnog stresa mogao biti glavni mehanizam koji podupire razvoj vaskularne endotelne disfunkcije.

Proizvodnja NO-a potaknuta laminarnim žilnim stresom barem je djelomično odgovorna za protokom potaknuto izlučivanje  $PGI_2$  (71,82), i ta je proizvodnja prostaciklina prvi dokumentirani odgovor endotelnih stanica na žilni stres (83).  $PGI_2$  je najmoćniji prirodni inhibitor agregacije trombocita. Proizvodnja i izlučivanje prostaciklina iz endotelnih stanica je povećana kod povećanih COX-2 ovisnih stanja. Studije su ovdje pokazale pozitivnu ulogu dušikovog oksida, budući da inhibitori eNOS-a uzrokuju ~ 50% smanjenje proizvodnje

prostaglandina (82), što nas dovodi do zaključka kako je polovica proizvodnje prostaciklina potaknuta žilnim stresom ovisna o signalizaciji dušikovog oksida.

### **1.2.1. Interakcija između mehanizma vazodilatacije dušikovog oksida i slobodnih kisikovih radikala**

O endotelu ovisna vazodilatacija uzrokovana  $H_2O_2$  u velikim žilama ovisna je o eNOS, a poništavaju ju i inhibitori NOS-a. Tako  $H_2O_2$  može akutno potaknuti eNOS proizvodnju NO-a (84). U stanjima kada je eNOS nesparena i proizvodi  $O_2^-$  radije nego NO u hipertenzivnim ili aterosklerotskim velikim žilama, endotel osigurava kompenzatornu dilataciju preko još nepoznatih mehanizama. Jedan je od mogućih načina izravna polarizacija stanica vaskularnog glatkog mišićja.  $H_2O_2$  u malim arterijama ima ulogu EDHF (85), a u velikim je cerebralnim arterijama aktivator kalijevih kanala (86). U humanim koronarnim arterijama protokom potaknuta dilatacija je posredovana endotelnim  $H_2O_2$  (87). U tim bi arteriolama enzimatski izvor  $H_2O_2$  mogao biti mitohondrijski respiratorni lanac, dok su u velikim žilama vaskularne NADPH oksidaze odgovorne za proizvodnju  $H_2O_2$  (85), što je u skladu s ranijim zapažanjima kako NO ima manju ulogu u vazodilataciji malih arterija. U koronarnim arteriolama  $H_2O_2$  potaknuta o endotelu ovisna vazorelaksacija je NO neovisna i dovodi do aktivacije COX-1 i kalijevih kanala glatkog mišićja (86). Jasno je dakle, da je  $H_2O_2$  u stanju posredovati o endotelu ovisnu vazorelaksaciju, ovisnu ili neovisnu o NO, budući da ju i sam može potaknuti (87) na još nepoznat način.

### **1.3. MEHANIZAM ACETILKOLINOM POTAKNUTE DILATACIJE (AChID)**

Mehanizam uključen u o endotelu ovisan vaskularni odgovor na acetilkolin (ACh) je već vrlo dobro razjašnjen otkada su ga prvi puta opisali Furchgott i Zawadzki 1980.godine (17). Smatra se da osim NO-a, endotelna hiperpolarizacija membrane vaskularnog glatkog mišićja, koju su prvi puta opisali Bolton i suradnici 1984. god. (88), doprinosi vazodilataciji kao odgovoru na acetilkolin. Odgovor na ACh, posredovan preko muskarinskih receptora i započetom utoku kalcija u endotelne stanice, uključuje ne samo stimulaciju eNOS-a koja dovodi do NO-om posredovane vazodilatacije, nego i aktivaciju endotelne fosfolipaze  $A_2$  ( $PLA_2$ ), dovodeći do otpuštanja arahidonske kiseline iz stanične membrane (89). EETs,

metaboliti citokrom P450 epoksigenaze, mogu potaknuti vazodilataciju hiperpolarizirajući vaskularne stanice glatkog mišićja (47) i na taj način imaju ulogu EDHF-a. Glavni endotelni vazoaktivni medijatori, NO, prostaglandini i EDHF, različito doprinose dilataciji potaknutoj acetilkolinom, ovisno o vaskulaturi, veličini žile, te o patofiziološkim uvjetima koji se proučavaju (4,35,50). Kod otporničkih je arterija doprinos EDHF-a o endotelu ovisnoj vazodilataciji veći nego kod velikih žila (50). Čini se da su ti medijatori u međuodnosu, bilo da dijele zajednički mehanizam djelovanja, bilo da neki poboljšavaju ili oblikuju djelovanje drugih, što je još uvijek otvoreno pitanje (90).

Neke su humane studije pokazale kako ACh djeluje putem muskarinskih receptora dovodeći do povećane proizvodnje dušikovog oksida i PGI<sub>2</sub>, stoga su oboje, NO- i PG- ovisni mehanizmi, uključeni u acetilkolinom potaknutu vazodilataciju (91). Neke su druge studije izvijestile da je vazodilatacija zečje karotidne arterije posredovana dvama različitim mehanizmima, jedan je ovisan o NO i akumulaciji cGMP-a, dok je drugi neovisan o dušikovom oksidu, vjerojatno se radi o mehanizmu hiperpolarizacije EDHF-a (92).

#### **1.4. ENDOTELNA DISFUNKCIJA (ED)**

Endotelna je disfunkcija danas općeprihvaćeni pojam koji opisuje stanje oštećenog endotela, odnosno njegove poremećene funkcije. Takav poremećaj endotela obuhvaća niz patofizioloških stanja, u rasponu od početne lokalizirane mehaničke ozljede žilne intime do neprimjerene, perzistentne, globalne endotelne aktivacije, važne za razvoj brojnih klinički manifestnih patoloških stanja. Dok je fenotip neaktivne, „mirne“ endotelne stanice antikoagulantni, protuupalni i vazodilatacijski, ED je promjena koju karakterizira proupalni, protrombotski i vazokonstriksijski fenotip. Kako je sposobnost otpuštanja vazoaktivnih tvari i reguliranje krvnog protoka ključna osobina zdravog endotela, tako je smanjena biodostupnost NO-a jedno od glavnih obilježja endotelne disfunkcije, kao i povećana proizvodnja slobodnih kisikovih radikala te apoptoza (93). Nesrazmjer raspoloživosti NO-a i aktivnosti vazokonstriksijskih čimbenika temelj je sklonosti vazokonstrikciji u ED-i, a on može biti uzrokovan nedostatkom NO-supstrata, L-arginina i/ili manjkom enzimatskog kofaktora tetrahidrobiopterina s pratećom nekompetentnošću eNOS-a. ROS modulira vaskularni tonus na nekoliko načina; izravno, djelujući kao EDCF, ili neizravno, potencirajući EDCF-om posredovan odgovor smanjujući biodostupnost NO-a (94,95).

U ranoj fazi, endotelna funkcija može biti djelomično održana kompenzatornim djelovanjem prostaciklina i/ili EDHF. Povećani je oksidativni stres vjerojatno jedan od glavnih mehanizama prisutan u razvoju endotelne disfunkcije, koji je prisutan u gotovo svakom stanju povezanom s aterosklerozom i kardiovaskularnim bolestima. Endotelna disfunkcija je proučavana kod hipertenzivnih bolesnika (96), kod normotenzivnih osoba s obiteljskom povijesti hipertenzije (97), kod aktivnih (98) i pasivnih (98) pušača, oboljelih od dijabetesa (100), kod pretilih osoba (101), kod bolesnika s upalnim ili infektivnim bolestima (102). Mnoga od navedenih stanja su također karakterizirana s povećanom proizvodnjom ROS-a i povećanim oksidativnim stresom (94).

#### **1.4.1. Oksidativni stres i proizvodnja slobodnih kisikovih radikala**

Slobodni kisikovi radikali se stvaraju za vrijeme različitih fizioloških metaboličkih procesa, a njihova pretjerana proizvodnja dovodi do nastanka oksidativnog stresa. Oni se proizvode u čitavoj vaskulaturi u svim vaskularnim stanicama (endotelnim, glatkim mišićnim) i također ih proizvode perivaskularni adipociti, a ROS-i sudjeluju u vaskularnoj staničnoj signalizaciji i u fiziološkim i u patološkim stanjima. Endotelne stanice proizvode slobodne kisikove radikale uključujući superoksid ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), dušikov oksid (NO), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), hidroksilni radikal ( $HO^\cdot$ ) i neke druge, koji mogu djelovati izravno kao EDCF (103) ili neizravno, smanjujući biodostupnost NO-a (104).

Mogući izvori proizvodnje endotelnih ROS-a uključuju mitohondrije, ksantin oksidazu, nesparenu NO sintetazu, enzime citokroma P450, i NADPH oksidazu. Osim toga, enzim kao što je lipooksigenaza može također stvarati  $O_2^-$  (105). Studije su pokazale kako je glavni prinosnik razine  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  u vaskularnim stanicama NADPH oksidaza, idući enzimatski put je ksantin-oksidaza, a zatim slijedi eNOS.

*Noxes* (NADPH oksidaze) je porodica enzima koji proizvode ROS, a postoji ih sedam, od kojih su četiri pronađeni kao izvor ROS-a u vaskulaturi: Nox1, Nox2, Nox4 i Nox5. Za Nox4 se smatra da je glavna izoforma izražena u endotelnim stanicama i stanicama vaskularnog glatkog mišićja (106), dok Nox5 izoforma proizvodi ROS kao odgovor na povećanu razinu unutarstaničnog  $Ca^{2+}$ , a proizvodi oboje, superoksidni anion i  $H_2O_2$  (107). ROS-i nastali pomoću Nox enzima zahvaćaju vaskularnu funkciju modulirajući



konstrikciju/dilataciju, rast vaskularnih stanica, apoptozu, starenje i opstanak, upalni odgovor, fibrozu, migraciju i kalcifikaciju (108).

Smanjena bi ekspresija eNOS-a mogla biti odgovorna za smanjenu proizvodnju NO-a, ali u većini situacija u kojima je pronađena endotelna disfunkcija, ekspresija eNOS-a je paradoksalno povećana, najvjerojatnije jer oksidativni stres proizvodi vodikov peroksid, koji povećava ekspresiju enzima. Endotelna disfunkcija povezana s tom povećanom ekspresijom eNOS-a pokazuje da je sposobnost proizvodnje NO-a smanjena ili je smanjena njegova biodostupnost. Smanjenje proizvodnje NO-a može biti pripisano nesparenoj eNOS, pri čemu je sam enzim izvor superoksidnog aniona i uzrok endotelne disfunkcije (13).

Nekoliko je sustava uklanjanja važno u reakcijama protiv ROS-a, uključujući enzime, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation-peroksidaza (GSH-Px), ali i neenzimatske antioksidanse, poput vitamina E i C,  $\beta$ -karotena. SOD predstavlja glavnu staničnu obranu od  $O_2^-$  i  $ONOO^-$  (109).

Studije su pokazale da jedinstveno  $H_2O_2$  ima sposobnost pojačavanja vlastite proizvodnje u vaskularnim stanicama i taj fenomen vjerojatno dobarinosi njegovom dugotrajnom patološkom učinku (110), patološkoj signalizaciji i nastanku vaskularnih bolesti (111).  $H_2O_2$  aktivira brojne signalne kaskade koje posreduju promjene u vaskularnoj funkciji uključujući povećan rast endotela, angigenezu, proliferaciju i hipertrofiju glatkih mišića, disfunkciju endotelne barijere, endotelnu apoptozu, indukciju upalnih proteina, interakciju endotela i leukocita, kao i vaskularnu pregradnju (110).

## 1.5. PRETILOST OPĆENITO

Pretilost je rezultat kompleksnog međudjelovanja genetskih, hormonalnih, fizioloških, anatomskih, psiholoških, bihevioralnih i okolišnih čimbenika koji uzrokuju neravnotežu između unosa i potrošnje energije. Prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije približno je 500 milijuna pretilih osoba širom svijeta (indeks tjelesne mase (ITM) veći od 30) i više od 1 milijarde odraslih s prekomjernom tjelesnom težinom (ITM veći od 27.3 za žene i 27.8 za muškarce). Pretilost predstavlja jedan od glavnih javnih zdravstvenih problema i eskalirajuća globalna epidemija prekomjerne tjelesne težine i pretilosti, nazvana „globesity“, zahvaća

mnoge krajeve svijeta, kako razvijene zemlje, tako i one u razvoju. Pretilost je složeno stanje sa ozbiljnim socijalnim i psihološkim dimenzijama koje zahvaćaju sve socioekonomske skupine. Jedan je od najvećih svjetskih ubojica, a od raznih bolesti povezanih s pretilosti godišnje umire oko 3 milijuna ljudi (112).

Za procjenu statusa težine bolesnika i potencijalnog zdravstvenog rizika koristi se nekoliko različitih mjerenja. Potpuna evaluacija uključuje procjenu dobi, težine, visine, sastava i raspodjele masnog tkiva, te prisutnost ili odsutnost drugih zdravstvenih problema ili faktora rizika. Mjera pretilosti koja je stekla naklonost među istraživačima i kliničarima je *indeks tjelesne mase* (ITM), koji predstavlja tjelesnu težinu u kilogramima podijeljenu s kvadratom tjelesne visine u metrima ( $(\text{težina u kg})/(\text{visina u m}^2)$ ). Svjetska zdravstvena organizacija predlaže slijedeću ITM podjelu: pothranjenost ( $\text{ITM} < 18.50 \text{ kg/m}^2$ ); normalna tjelesna težina ( $\text{ITM } 18.50\text{-}24.99 \text{ kg/m}^2$ ); prekomjerna tjelesna težina ( $\text{ITM} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ); pretilost ( $\text{ITM} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ), koje se dijeli u 3 stupnja: stupanj I ( $\text{ITM } 30.00\text{-}34.99 \text{ kg/m}^2$ ); stupanj II ( $\text{ITM } 35.00\text{-}39.99 \text{ kg/m}^2$ ) i stupanj III ( $\text{ITM} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) (112).

Pretilost je povezana s niskim stupnjem kronične upale (113). Bray je definirao pretilost kao kroničnu bolest, baš poput hipertenzije i/ili ateroskleroze (114). Pretilost je karakterizirana klasičnim upalnim odgovorom na patogene, uključujući porast koncentracije cirkulirajućih citokina i adipokina, migraciju leukocita u upalno područje, aktivaciju tkivnih leukocita i reparativni tkivni odgovor (115).

### **1.5.1. Masno tkivo, adipokini i vaskularni endotel**

Masno je tkivo aktivni endokrini i parakrini organ koji izlučuje nekoliko medijatora, adipokina, uključujući hormone, upalne citokine i druge proteine. Najvažniji su od njih leptin, adiponektin, tumor nekrotizirajući faktor (TNF)  $\alpha$ , interleukin (IL) 6, inhibitor aktivacije plazminogena (PAI)-1, rezistin i proteini renin–angiotenzin sustava (116,117). Sekretorni proteini adipocita, adipokini, mogu utjecati na endotelnu funkciju pa stoga mogu imati značajnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih bolesti kod pretilih osoba (118,119).

Rastući broj dokaza izdvaja masno tkivo općenito, a posebice visceralno masno tkivo, kao ključni regulator upale. Pretilost je karakterizirana kroničnom upalom niskog stupnja i u

pretilosti masno tkivo postaje disfunkcionalno; dovodi do povećane proizvodnje proupalnih adipokina i smanjene proizvodnje protuupalnih adipokina, posljedične hiperplazije i hipertrofije masnih stanica te disbalansa u otpuštanju adipokina. To stanje povećava kontraktilnost i upalu te dovodi do vaskularnih bolesti poput hipertenzije, ateroskleroze i vaskularne disfunkcije (120).

*Leptin* je prvi opisani adipokin (121), koji ima središnji i periferni utjecaj na metaboličke i upalne procese. U središnjem živčanom sustavu potiče gubitak tjelesne težine prilikom smanjenog unosa hrane i povećane potrošnje energije. Neke su studije pokazale da leptin ima široki utjecaj na endotelnu funkciju i vaskularnu homeostazu (122). *In vitro* su studije dokazale da leptin uzrokuje oksidativni stres i u kulturi endotelnih stanica na način da povećava proizvodnju ROS-a (123). Također potiče lučenje proupalnih citokina, što dovodi do hipertenzije, ali i zahvaća endotelnu funkciju (124,125). Poznato je kako leptin može imati i izravan učinak na sniženje arterijskog tlaka, a neke su studije pokazale da je vazodilatacija uzrokovana leptinom posredovana putem EDHF-a (126,127). Taj vazodilatorni učinak neovisan o dušikovom oksidu potvrdio je Matsuda u humanim koronarnim arterijama (128). Ipak, neke su druge studije pokazale da leptin može potaknuti vazodilataciju stimulirajući NO (129). Mastronardi i suradnici su pretpostavili da je otpuštanje NO-a potaknuto leptinom određeno izravnim učinkom na endotel, ali i neizravnim učinkom na adipocite, što ukazuje na važnu ulogu adipocita u otpuštanju dušikovitog oksida aktiviranjem NO sintetaze (130).

*Rezistin*, peptid kojeg luče adipociti, ima ulogu u razvoju inzulinske rezistencije i pretilosti (131). Razina rezistina je povećana u pretilosti te on inhibira unos glukoze u stanice skeletnog mišićja u animalnim modelima. Visoke su razine rezistina povezane s endotelnom disfunkcijom; studije su pokazale da rezistin izravno aktivira endotelne stanice promicanjem endotelina-1, bez promjene u proizvodnji NO-a, i povećanim otpuštanjem adhezijskih molekula (132).

*Adiponektin*, jedna od glavnih aktivnih molekula izlučenih iz bijelog masnog tkiva, ima važnu ulogu u homeostazi glukoze i metabolizma lipida (133,134). Za razliku od leptina i drugih adipokina, cirkulirajuće razine adiponektina i pretilost međusobno su u obrnutno proporcionalnom odnosu (135). Također je jedini od svih adipokina koji ima obje značajke, protuupalnu i antiaterogeničku, te štiti od kardiovaskularnih bolesti (136). Svoju protuupalnu ulogu izražava inhibirajući upalne puteve u adipocitima i makrofazima te potiče lučenje protuupalnog citokina, IL-10 (137). Osim toga, adiponektin ima sposobnost izravnog

poticanja proizvodnje NO-a u endotelnim stanicama (138), čija povećana proizvodnja inhibira agregaciju trombocita, adheziju leukocita za endotelne stanice i proliferaciju stanica vaskularnog glatkog mišićja. Također, smanjuje oksidativni stres smanjujući proizvodnju ROS-a. Adiponektin ima snažan antiaterogenetski učinak, koji je dokazan i humanim *in vivo* istraživanjima. Ouchi i suradnici su pokazali da razina adiponektina u plazmi snažno korelira sa vazodilatatornim odgovorom na reaktivnu hiperemiju, što je događaj posredovan dušikovim oksidom (139). Također su pokazali da je snižena razina adiponektina povezana s oslabljenom endotelnom funkcijom i koronarnom arterijskom bolesti (140). Niska je razina adiponektina neovisan pokazatelj rane ateroskleroze kod pretilih osoba (136).

*TNF $\alpha$*  je jedan od najistraživanijih proupalnih citokina kojeg proizvode različite vrste stanica (141). Smatra se da ima određenu ulogu u inzulinskoj rezistenciji, ali također ima i ključnu ulogu u održavanju upalnog odgovora i apoptoze (142). *TNF $\alpha$*  može inhibirati endotelnu NO sintetazu i smanjiti proizvodnju dušikovog oksida, te na taj način povećava oksidativni stres i endotelnu disfunkciju (143,144). Neke su studije pokazale da vazodilatacija posredovana putem *TNF $\alpha$*  povećava proizvodnju NO-a i prostaglandina, dok druge studije ukazuju na važnu ulogu vodikovog peroksida (145). Također je pokazano da *TNF $\alpha$*  posreduje u povećanju endotelne permeabilnosti aktivirajući NADPH oksidaze (146). Povećana proizvodnja *TNF $\alpha$*  dovodi do povećanog stvaranja ROS-a, endotelne disfunkcije u pretilosti te bolesti povezanih uz pretilost (145).

*IL-6* je također citokin koji se prvenstveno otpušta iz masnog tkiva u krvni optok (117). Povezan je s pretilosti i inzulinskom rezistencijom (147). Neke su studije pokazale da *IL-6* ima negativan utjecaj na endotelnu funkciju, povećava permeabilnost endotelnih stanica mijenjajući morfologiju membrane (148). *IL-6* može uzrokovati endotelnu disfunkciju (149), a serumska je razina *IL-6* povezana sa razvojem kardiovaskularnih bolesti (150).

*C reaktivni protein (CRP)* je marker niske razine kronične upale i povezan je s metaboličkim sindromom (151). Neke su studije, kada se govori o upalnom odgovoru u pretilosti, ukazale na važnost abdominalnog depoa masti, jer je ono izvor *IL-6* koji potiče sintezu *CRP*-a u jetri (152). Kod pretilih osoba povišene razine *CRP*-a u plazmi, osim što predstavljaju marker upale, ukazuju i na to da bi *CRP* mogao izravno doprinijeti endotelnoj disfunkciji (153). Endotelne stanice, u uvjetima visoke razine *CRP*-a u plazmi, smanjuju proizvodnju NO-a i ekspresiju eNOS-a (154). Čini se da bi povećana količina citokina mogla

biti odgovorna za povećan rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti kod ljudi sa abdominalnim oblikom pretilosti.

### **1.5.2. Metabolički zdrava pretilost**

Postoje pretile osobe koje su zaštićene, ili su više rezistentne, od razvoja komorbiditeta udruženih sa pretilosti. One su metabolički zdrave, ali pretile individue. Imaju povoljan metabolički profil kojeg obilježava normalna razina inzulinske senzitivnosti, normalni lipidni i upalni parametri, kao i odsutnost znakova hipertenzije, jedino imaju prekomjernu tjelesnu debljinu ( $ITM \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) (155,156). Zanimljivo je da je zabilježeno približno 20-30% pretilih osoba koje su metabolički zdrave (157).

U svojoj su studiji Stefan i suradnici (158) potvrdili postojanje metabolički zdravih, ali pretilih osoba, te su pokušali objasniti njihov povoljan metabolički profil. Oni imaju manje količine visceralnog masnog tkiva nego inzulini-rezistentni pretili ljudi, te bolju sposobnost hvatanja masnih kiselina u masnom tkivu. Također, imaju manju debljinu intima-media sloja karotidnih arterija, što predstavlja povoljan kardiovaskularan profil. IL-6, TNF- $\alpha$  i drugi citokini i adipokini, kao što je rezistin i adiponektin, povezani su s metaboličkim promjenama (159), te su usko povezani s abdominalnim oblikom pretilosti, posebice visceralnog masnog tkiva. Neki dokazi ukazuju na povezanost veće količine potkožnog masnog tkiva s povoljnijim upalnim profilom (156).

## **1.6. VISCERALNO I POTKOŽNO MASNO TKIIVO**

Bijelo masno tkivo nije samo organ mjesta skladištenja energije, već je i ključna sastavnica metaboličkog homeostatskog mehanizma. Ono ima glavnu ulogu u metabolizmu lipida i i glukoze, a lučenjem adipokina i hormona zahvaća i mnoge druge fiziološke i patološke procese. Tjelesna je raspodijeljenost bijelog masnog tkiva u visceralno (VAT), koje okružuje unutrašnje organe u abdominalnoj šupljini i medijastinumu, i potkožno (SAT) masno tkivo, koje se nalazi ispod površine kože (160). Značajna je štetnost viška nakupljanja visceralnog masnog tkiva, koje se smatra najaktivnijim skladištem masnog tkiva, jer promiče sistemsku upalu u pretilih ljudi (161). Povećane količine abdominalnog visceralnog masnog tkiva, neovisno o ukupnoj tjelesnoj pretilosti, povezane su s razvojem endotelne disfunkcije i kardiovaskularnih bolesti (162,163). Potkožno masno tkivo smatra se manje metabolički

aktivnim od visceralnog masnog tkiva. Bolesnici s povećanim količinama visceralnog masnog tkiva imaju veći rizik od razvoja metaboličkog sindroma, dijabetesa tipa 2 i kardiovaskularnih bolesti, nego oni sa sličnim količinama potkožnog masnog tkiva (162,164). Neke su studije pokazale kako je nakupljanje visceralnog masnog tkiva povezano s oštećenom endotelnom funkcijom i povećanom krutosti velikih arterija (165,166).

Potkožno i visceralno masno tkivo pokazuju funkcionalne razlike. Bakker i suradnici ukazuju da visceralno masno tkivo sadrži veći broj makrofaga i monocita nego potkožno masno tkivo (167). Visceralno je masno tkivo glavni prinosnik plazmatske razine IL-6, koji potiče stvaranje CRP-a i drugih proteina uključenih u homeostazu (152). Visceralno masno tkivo pokazuje jaču povezanost s upalom i markerima oksidativnog stresa uspoređujući ga s potkožnim masnim tkivom (168). Uslijed stalnih otpuštanja upalnih citokina i masnih kiselina iz visceralnom i potkožnog masnog tkiva, endotel im je stalno izložen, što dovodi do endotelne disfunkcije i razvoja kardiovaskularnih bolesti. Pretilost je glavni rizični čimbenik za preuranjenu smrt kao posljedicu kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti (169-172), čija je prisutnost povezana s povećanim brojem bolesti velikih arterija (npr. srčani ili moždani udar), ali i bolesti mikrocirkulacije (npr. retinopatija, nefropatija, srčano zatajenje) (114,173-175).

### **1.6.1. Pretilost i endotelna disfunkcija**

U pretilosti, kronično izlaganje endotelnih stanica povišenoj razini masnih kiselina i upalnim citokinima povećava nastanak ROS-a, koji tada dovode do endotelne disfunkcije. Endotelna disfunkcija kod pretilih uzrokovat će neravnotežu između vazodilatacije i vazokonstrikcije, odnosno, prevladat će vazokonstrikcija. To je stanje obilježeno oštećenom aktivnosti eNOS-a, smanjenom proizvodnjom NO-a i time smanjenjem o NO-u ovisne vazodilatacije (176,177). Nadalje, kod pretilih ljudi endotelna disfunkcija aktivira nekoliko mehanizama koji dovode do povećane vaskularne reaktivnosti (156,167).

Dugotrajno izlaganje endotela visokim koncentracijama cirkulirajućih upalnih citokina dovodi do ekspresije adhezijskih molekula i vezanja leukocita i makrofaga za endotel, što će uzrokovati lokalnu proizvodnju citokina te posljedično smanjenje cjelovitosti endotela i proliferaciju stanica vaskularnog glatkog mišićja (156,167).

Također, i kod životinja nakupljanje masti kolerira sa sistemskim oksidativnim stresom. Proupalni citokini, ne samo da smanjuju proizvodnju NO-a, nego smanjuju i njegovu biodostupnost zbog povećane biodostupnosti ROS-a. Nekoliko izvora ROS-a, kao što su

NADPH oksidaza, ksantin oksidaza, nesparena eNOS, i mitohondrijski respiratorni lanac, mogu biti potaknuti proupalnim citokinima u endotelnim stanicama (145). Kod pretilih miševa proizvodnja ROS-a u masnom je tkivu povezana s povećanom ekspresijom NADPH oksidaze i smanjenom ekspresijom antioksidativnih enzima (178). Nadalje, u staničnoj kulturi adipocita je pokazano da povećana razina masnih kiselina povećava oksidativni stres putem NADPH oksidaze, a to povećanje oksidativnog stresa uzrokuje disregulaciju proizvodnje adipocitokina, povećanu proizvodnju proupalnih i smanjenu proizvodnju protuupalnih adipokina (120). Kao što je već spomenuto, oksidativni stres smanjuje biodostupnost dušikovog oksida, a drugi čimbenici povezani s pretilosti (slobodne masne kiseline) također mogu doprinijeti povećanju oksidativnog stresa i smanjenju biodostupnosti NO-a (179). Ove spoznaje ukazuju na to da povećanje oksidativnog stresa u skladištima masnog tkiva ima glavnu ulogu u razvoju endotelne disfunkcije u ljudskoj pretilosti.

Neke su studije pokazale da je visceralna pretilost karakterizirana ne samo s o endotelu ovisnom, već i o NO-u neovisnom disfunkcijom. Vidljive su promjene krvnog protoka podlaktice u odgovoru na dodavanje bradikininu oslabljene, a bradikininom posredovana vazodilatacija podlaktične mikrocirkulacije postoji unatoč inhibiciji ciklooksigenaze i NO-a, što ukazuje na alternativne vazodilatorne mehanizme kao što je otpuštanje EDHF-a (165). Promjene protoka krvi kroz podlakticu, kao odgovor na dodavanje bradikininu, su oslabljene neovisno o inhibiciji NOS-a i COX-a; postoji znatna vazodilatacija podlaktične mikrocirkulacije unatoč inhibiciji NOS-a i COX-a, što ukazuje na alternativne vazodilatorne mehanizme kao što je otpuštanje EDHF-a (165).

Kod pretilosti je smanjena proizvodnja NO-a, a pokazalo se da je proizvodnja EDHF-a iz karotidne arterije pretilih miševa u suvišku (180). Traupe i suradnici su pronašli povećanu vazokonstrukciju ovisnu o prostanooidima, kao i gensku ekspresiju vaskularnih receptora tromboksana u pretilosti (181). Ista je grupa znanstvenika pokazala da u pretilosti endotelin modulira povećanu vazokonstrukciju ovisnu o endotelu (182). Mather i suradnici su također predložili vrlo važnu ulogu endotelina u određivanju endotelne disfunkcije koja nastaje u pretilosti (183,184).

Raspodjela masnog tkiva, više nego pretilost sama po sebi, negativno utječe na endotelnu funkciju. Jačina endotelne disfunkcije korelira sa stupnjem visceralne pretilosti, koja ima glavnu ulogu u razvoju metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti povezanih s pretilosti, kao što su inzulinska rezistencija, intolerancija glukoze, dislipidemija, hipertenzija (145). Hashimoto i suradnici su pokazali da su osobe s visceralnim oblikom pretilosti, više od

onih s potkožnim, povezane s oštećenom protkom posredovanom o endotelu ovisnom vazodilatacijom brahijalne arterije (185).

Masno tkivo, također, okružuje gotovo svaku krvnu žilu u ljudskom tijelu – perivaskularno masno tkivo. Ono predstavlja strukturalnu potporu krvne žile, no nedavni podaci prepoznaju perivaskularno masno tkivo kao aktivnog doprinositelja vaskularnoj funkciji. Ono može oblikovati vaskularni odgovor na vazoaktivne tvari otpuštajući vazodilatorne ili vazokonstriktorne čimbenike, kao i raznovrsne adipokine koji potiču lokalnu upalu. Poput ukupnog masnog tkiva, perivaskularno je masno tkivo povećano kod pretilih ljudi, kao i kod životinjskih modela pretilosti (186). U normalnim uvjetima perivaskularno masno tkivo otpušta vazorelaksanse koji potiču i o endotelu ovisnu, kao i o endotelu neovisnu, vazodilataciju krvnih žila. U stanju pretilosti, perivaskularno masno tkivo luči vazokonstriktorne faktore i proupalne adipokine koji su važni u aktivaciji endotelnih stanica i vaskularnoj upali. Nekoliko adipokina neizravno oštećuju vaskularnu funkciju aktivirajući simpatički živčani sustav u mozgu (leptin) ili djelujući u glavnim metaboličkim organima, dovodeći do endotelne disfunkcije. Takva je sekrecija adipokina i drugih vazoaktivnih tvari u masnom tkivu glavni doprinosioc razvoju i progresiji metaboličkih i vaskularnih komplikacija povezanih s pretilosti (187). Tako, osim visceralnog, perivaskularno masno tkivo, također, doprinosi endotelnoj disfunkciji.

Nekoliko je studija, koje istražuju utjecaj pretilosti na mikrocirkulaciju, pokazalo kako se mikrovaskularna disfunkcija razvija i kod pokusnih životinjskih modela, kao i kod pretilih ljudi. Pretilost negativno utječe na endotelnu funkciju i dovodi do endotelne disfunkcije sa smanjenim otpuštanjem dilatacijskih čimbenika (NO), ali povećanim stvaranjem vazokonstriktornih posrednika (EDCF) (188). Kod pretilih osoba, Farb i suradnici su pokazali jako oštećenje vaskularne endotelne funkcije visceralnog masnog tkiva uspoređujući ga s potkožnim. Dokazali su pojačanu ekspresiju proupalnih, s oksidativnim stresom povezanih gena, kao i pojačano stvaranje proupalnih citokina u visceralnom masnom tkivu, te su zaključili da je utjecaj visceralnog mikrookoliša više toksičan na vaskulaturu. Također su predložili ciklooksigenazom posredovane vazokonstriktore, prostanoide, kao djelomične doprinosioce endotelne disfunkcije arteriola visceralnom masnog tkiva kod ljudske pretilosti (189,190).



Mnogo je dokaza o tome kako endotelna disfunkcija prethodi i upućuje na kliničku bolest (164,191), čime je endotelna disfunkcija i oštećena vaskularna reaktivnost početni korak u razvoju kardiovaskularnih komplikacija koje uzrokuje pretilost. Upravo bi radi navedenog endotelna disfunkcija u masnome tkivu mogla biti snažan prognostički čimbenik budućih kardiovaskularnih događanja (192).

Iako je visceralno masno tkivo veći kardiovaskularni rizični čimbenik (163-165), metabolička uloga endotelne funkcije u vicerálnom, kao i pokožnom, masnom tkivu još nije u potpunosti objašnjena.

## **2. HIPOTEZA**

Glavna je hipoteza ove studije da je mikrovaskularna osjetljivost na protokom posredovanu dilataciju (FID), kao i acetilkolinom posredovanu dilataciju (AChID), smanjena u krvnim žilama visceralnog masnog tkiva u usporedbi s potkožnim masnim tkivom kod pretilih osoba; kao i da su mehanizmi vaskularne reaktivnosti otporničkih krvnih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva različiti u ljudskoj pretilosti.

### 3. CILJEVI

Glavni je cilj ovog istraživanja odrediti utjecaj potkožnog i visceralnog masnog tkiva na vaskularnu reaktivnost i endotelnu funkciju ljudskih otporničkih krvnih žila u odgovoru na o endotelu ovisne podražaje (povećanje protoka i acetilkolin), i pokušati barem djelomično objasniti mehanizme izmijenjene vaskularne funkcije kod pretilih osoba.

Specifični su ciljevi ovog istraživanja:

- 1) Odrediti utjecaj prisutnosti velike količine masnog tkiva na arterijski tlak, razinu glukoze i lipida u krvi kod zdravih pretilih žena
- 2) Odrediti utjecaj masnog tkiva na promjene vaskularne reaktivnosti otporničkih krvnih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva kod pretilih žena
- 3) Odrediti ulogu metabolita arahidonske kiseline u mehanizmima protokom i acetilkolinom posredovane vazodilatacije otporničkih krvnih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva kod zdravih pretilih žena
  - Ulogu dušikovog oksida, koristeći inhibitor NO sintetaze, *N*<sup>o</sup>-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME)
  - Ulogu metabolita ciklooksigenaze, koristeći neselektivni inhibitor COX-a 1 i COX-a 2 , indometacin (INDO)
  - Ulogu metabolita citokroma P450, koristeći njegov neselektivni inhibitor 17-octadecynoic acid (17-ODYA)
  - Ulogu slobodnog radikala kisika H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koristeći sakupljač H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, poli-etilenglikol katalazu (PEG-CAT)

## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Populacija ispitanika**

U istraživanju su sudjelovale pedeset i tri (53) pretila žene koje su išle na planiranu barijatrijsku operaciju. Svaka je ispitanica bila obavještena o ispitivanju te je potpisala informirani pristanak. Protokol i postupak istraživanja zadovoljili su standarde najnovijeg izdanja Helsinške deklaracije, a bili su odobreni od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta Illionis u Chicagu, SAD.

Sve su ispitanice bile premenopauzalne, u dobi između 21 i 49 godina starosti. Žene mlađe od 21 godinu nisu bile uključene u istraživanje kako bi se isključio utjecaj rasta na važne biomarkere, a postmenopauzalne žene nisu bile uključene u studiju kako bi se heterogenost uzoraka svela na minimum.

Isključni su kriteriji bili: dijabetes mellitus, trudnoća, maligno oboljenje, pušenje, bolesti bubrega, bolesti jetre, bolesti žučnjaka, reumatoidni artritis, HIV/AIDS i upalne bolesti crijeva. Deset ispitanica uzimalo je lijekove za liječenje hipertenzije, a sedam za želučani refluks.

### **4.2. Antropometrijska i metabolička mjerenja**

Ispitanicama su određene antropometrijske mjere ( visina i težina, indeks tjelesne mase, opseg struka), izmjeren im je krvni tlak, a iz uzoraka krvi koji su dobiveni natašte određeni su biokemijski parametri (razina glukoze, inzulina, lipida).

### **4.3. Prikupljanje uzoraka**

Svakoj je ispitanici za vrijeme planirane barijatrijske operacije pretilosti rađena biopsija potkožnog i visceralnog masnog tkiva, u Centru za znanstvena istraživanja na Sveučilištu Illinois (University of Illinois Hospital and Health Sciences Center). Potkožno masno tkivo dobiveno je iz donjeg trbušnog zida, a visceralno iz velikog omentuma. Uzorci

su stavljeni u hladnu (4°C) HEPES buffer otopinu. Arteriole su izolirane iz masnoga tkiva, očišćene od vezivnog tkiva, pripremljene za fiziološki pokus.

#### 4.4. Pripremanje uzoraka i protokol fiziološkog pokusa

Koristeći mikrokirurške instrumente i operacijski mikroskop, otporničke su arteriole izolirane i postavljene u komoricu koja sadrži dvije staklene mikropipete (promjera vanjskog vrha ~40 µm), ispunjenu sa Krebs otopinom, koja se sastoji od (u mM) 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.25 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11 glukoze. Oba su kraja žile pričvršćena s tankim šavom (10-0 nylon Ethilon). Na početku svakog eksperimenta žila se inkubira kroz 30 minuta pri intarluminalnom tlaku od 60 cmH<sub>2</sub>O. Mikroskop iznad komorice (povećava sliku 200x) je pričvršćen na video kameru koja je spojena s uređajem za mjerenje (model VIA-100; Boeckeler) i monitorom koji prikazuje sliku žile i mjeri promjenu promjera. Žile će biti perfundirane i uronjene u toplu (37°C) fiziološku buffer otopinu (pH = 7.4 ± 0.05, PO<sub>2</sub> = 140 ± 10 mmHg) i oksigenirane sa smjesom plinova 21% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> i 74% N<sub>2</sub> (79).

Na početku svakog fiziološkog pokusa, unutarnji je promjer postavljene žile izmjeren u stabilnom stanju (pri 60 cmH<sub>2</sub>O) te nakon dodavanja endotelina-1, nakon čega slijede protkom potaknute promjene promjera krvne žile. Žile koje na endotelin-1 nisu postigle konstrikciju veću od 30% su bile isključene iz analize. Protok je dobivan istovremenim promjenama visine spremnika s jednakim količinama otpine, ali u suprotnim smjerovima kako bi se dobile razlike tlaka od Δ10, Δ20, Δ40, Δ60, Δ100 cmH<sub>2</sub>O. U zasebnim je pokusima određivana dilatacija tih istih krvnih žila na acetilkolin (ACh, 10<sup>-9</sup> to 10<sup>-4</sup> M). Protokom posredovana dilatacija (FID), kao i acetilkolinom-posredovana dilatacija (AChID), otporničkih arteriola određivane su u prisutnosti i odsutnosti: a) inhibitora NO sintaze (NOS) N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME; 10<sup>-4</sup> M), b) inhibitora ciklooksigenaze indometacina (INDO; 10<sup>-5</sup> M), c) sakupljača H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-a, polietilenglikol katalaze (PEG-CAT; 500 U/ml), te d) neselektivnog inhibitora citokroma P450, 17-octadecynoic acid (17-ODYA; 10<sup>-5</sup> M). Inhibitori su dodavani u komoricu, a inkubacija je trajala 30 minuta.

O endotelu neovisna dilatacija pojedinih krvnih žila je ispitana dodavanjem izravnog donora dušikovog oksida, natrijevog nitroprusida (SNP).

Maksimalni je promjer krvne žile (o endotelu neovisna dilatacija) određivan u prisutnosti papaverina ( $10^{-4}$  M) na kraju svakog pokusa.

#### **4.5. Određivanje stanične proizvodnje NO-a i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metodom imunofluorescencije**

Vaskularna je proizvodnja dušikovog oksida određivana pomoću kita za određivanje NO-a. Nefluorescentna, stanično-propusna, boja za određivanje NO-a reagira sa NO u prisutnosti O<sub>2</sub>, i to visoko specifično, s visokom osjetljivošću i visokom preciznošću, dajući u vodi netopljiv crveni fluorescentni proizvod. Dodavanjem diklorodehidrofluorescein diacetata (DCF-DA; 2  $\mu$ M) određivana je proizvodnja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, u prisutnosti i odsutnosti protoka i PEG-CAT-e (500 U/ml). Fluorescentni je proizvod pobuđen sa svjetlosti 650-nm valne duljine sa emisijskim spektrom od 670 nm za NO i DCF-DA fluorescencija pobuđena je s 488 nm valne duljine s emisijskim spektrom od 527 nm koristeći kripton/argon fluorescentni mikroskop (Nikon eclipse 80i). Protokom potaknuta proizvodnja NO-a je također određivana. Krvne su žile kanulirane i kroz 30 su minuta održavane na temperaturi od 37 °C i pri tlaku ekvibracije od 60 mmH<sub>2</sub>O, nakon čega su bile izložene protoku ( $\Delta$ 60 cmH<sub>2</sub>O) u prisutnosti i odsutnosti L-NAME ( $10^{-4}$  M) i katalaze (500 U/ml). Žile su zatim bile izložene boji za određivanje NO-a ili DCF-DA, kroz daljnjih 30 minuta, zatim su isprane u HEPES bufferu i namještene na slikokaze za dobivanje slika. Intenzitet fluorescencije dobivenih slika određivan je uz pomoć *NIH image* softvera (Image J).

#### **4.6. Materijali**

Kit za određivanje NO-a je dobavljen od Enzo Life Sciences, a DCF-DA boja od Life Technologies. Preostale su kemikalije kupljene od proizvođača Sigma-Aldrich. Navedene su konačne molarne koncentracije pojedinih tvari u komorici. Farmakološki antagonisti ili inhibitori nisu proizvodili značajne promjene bazičnog promjera krvne žile i doveli su do manje od 1% promjena u ukupnom obujmu.

#### 4.7. Statistička analiza

Svi su rezultati prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM (osim podataka u Tablici 1 koji su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SD). Dilatacija koju proizvodi protok i acetilkolin je izražena u postotku, gdje 100% predstavlja promjenu od promjera kontrahirane žile do maksimalnog promjera pri 60 cmH<sub>2</sub>O (obično u prisutnosti papaverina). Odgovor na protok i acetilkolin analiziran je s Two-Way ANOVA testom za ponavljane uzorke (engl. repeated measures ANOVA), kako bi se odredio učinak tretmana na odgovor krvne žile. Za usporedbu maksimalne intraluminalne dilatacije na papaverin između eksperimentalnih skupina, korišten je Studentov t-test (engl. student t-test). Kada varijable nisu bile normalno raspodijeljene, primijenjen je Mann –Whitneyev U-test (eng. Mann-Whitney Rank Sum Test). Statistička je značajnost podešena na  $P < 0.05$ . Za statističku je analizu uporabljen SigmaPlot v.12 (Systat Software, Inc, Chicago,USA).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Karakteristike ispitanika

U studiji su sudjelovale pedeset tri (53) pretila žene koje su bile podvrgnute planiranoj barijatrijskoj operaciji (prosječna godina je  $36 \pm 6$ ), prosječnog indeksa tjelesne mase (ITM)  $48 \pm 10 \text{ kg/m}^2$ . Tablica 1 prikazuje antropometrijske, biokemijske i hemodinamske mjere ispitanica od kojih su dobivene krvne žile za fiziološki pokus. Prosječna vrijednost od tri mjerenja arterijskog tlak potvrđuje da su sve ispitanice bile normotenzivne, dok je deset ispitanica uzimalo antihipertenzivnu terapiju (19%), a njih je sedam uzimalo lijekove za želučani refluks (13%). Nije postojala razlika reaktivnosti krvnih žila između ispitanica koje su uzimale lijekove i onih koje nisu uzimale lijekove.

**Tablica 1. Antropometrijske, biokemijske i hemodinamske mjere**

	rezultati	referentne vrijednosti
Broj ispitanica	53	/
Starost (godine)	$36 \pm 6$	26-48
Visina (cm)	$165 \pm 6$	150-183
Težina (kg)	$133 \pm 27$	83-176
ITM ( $\text{kg/m}^2$ )	$48 \pm 10$	35-70
Glukoza (mg/dL)	$87 \pm 15$	61-138
Trigliceridi (mg/dL)	$135 \pm 74$	27-312
Ukupni kolesterol (mg/dL)	$173 \pm 28$	117-235
HDL kolesterol (mg/dL)	$42 \pm 7$	25-144
LDL kolesterol (mg/dL)	$111 \pm 25$	54-165
SBP (mmHg)	$125 \pm 16$	96-175
DBP (mmHg)	$73 \pm 11$	43-93
MAP (mmHg)	$91 \pm 11$	61-111

Vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost $\pm$ SD

ITM – Indeks Tjelesne Mase; HDL –lipoprotein visoke gustoće;

LDL –lipoprotein niske gustoće; SBP –sistolčki arterijski tlak;

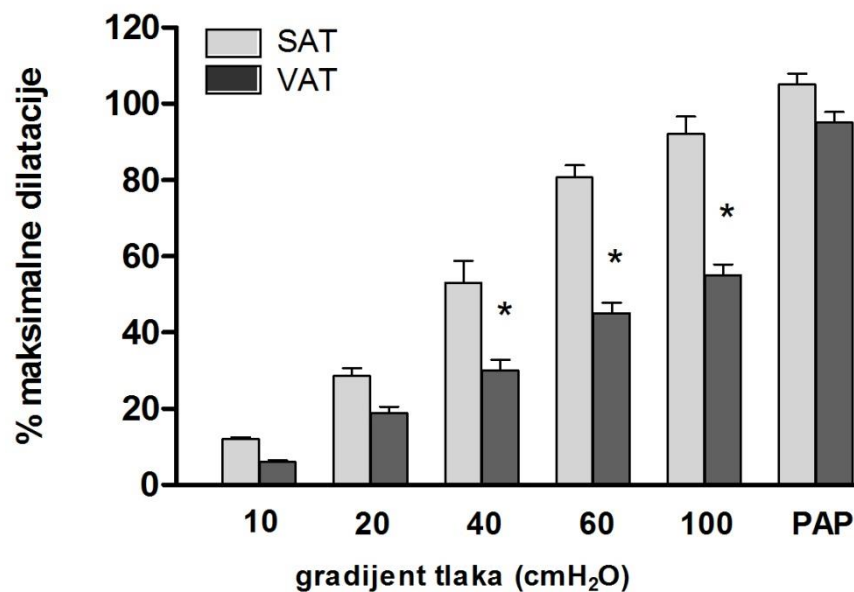
DBP –dijastolički arterijski tlak; MAP –srednji arterijski tlak



## 5.2. Bazični odgovor potkožnih i visceralnih otporničkih arteriola na protokom i acetilkolinom potaknutu dilataciju

Prosječni promjer krvnih žila potkožnog masnog tkiva je bio  $151 \pm 20 \mu\text{m}$ , a krvnih žila visceralnog masnog tkiva  $161 \pm 13 \mu\text{m}$  ( $P=0.5$ ). Prosječna doza ET-1 koja je kontrahirala krvne žile za 30-50 % u odnosu na njihov bazalni promjer je bila  $159 \pm 4 \text{ pM}$  za krvne žile potkožnog masnog tkiva (SAT) i  $165 \pm 4 \text{ pM}$  za krvne žile visceralnog masnog tkiva (VAT). Nije postojala statistička značajnost između konačnih kontrahiranih promjera kod SAT ( $101.9 \pm 10 \mu\text{m}$ ) i VAT ( $89.6 \pm 10 \mu\text{m}$ ;  $P=0.4$ ) žila.

Dilatacijski je odgovor otporničkih žila visceralnog masnog tkiva ( $n=21$ ) manje osjetljiv na protok uspoređujući s otporničkim žilama potkožnog masnog tkiva pri gradijentu tlaka  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100 \text{ cm H}_2\text{O}$  ( $n=17$ ) ( $P<0.001$ ). Između potkožnog i visceralnog masnog tkiva nema razlike u o endotelu neovisnoj dilataciji na papaverin. Ovi podaci ukazuju na smanjenu osjetljivost otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva na o endotelu ovisnu vazodilataciju, ali ne i na dilataciju neovisnu o endotelu.



\*  $P<0.001$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

SAT - potkožno masno tkivo

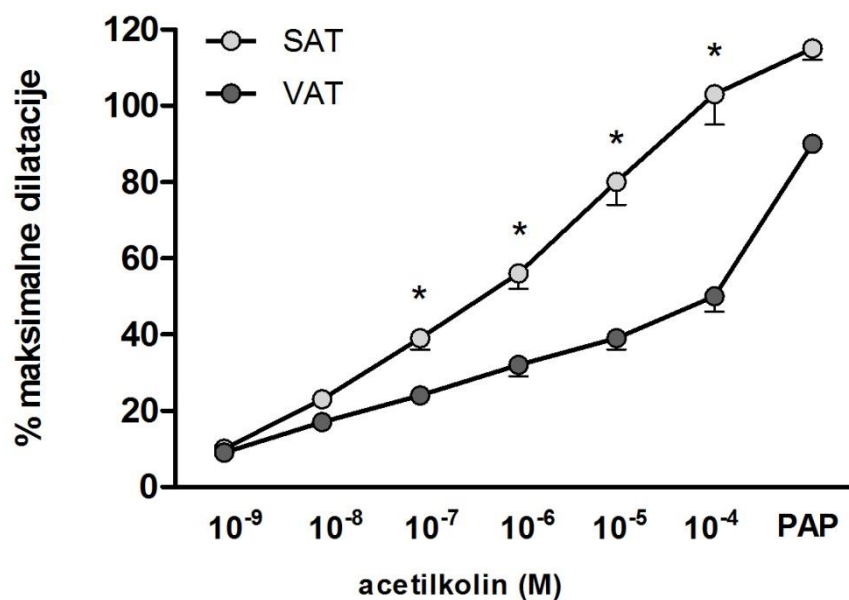
VAT - visceralno masno tkivo

PAP - papaverin

**Slika 1. Bazični odgovor otporničkih arteriola potkožnog (SAT) i visceralnog (VAT) masnog tkiva na protokom potaknutu dilataciju (FID)**

Vazodilatacijski odgovor otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva je manje osjetljiv na protok uspoređujući ga s otporničkim arteriolama potkožnog masnog tkiva pri gradijentu tlaka  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  cm H<sub>2</sub>O.

Slično, otporničke krvne žile visceralnog masnog tkiva manje su osjetljive na acetilkolin uspoređujući ih s otporničkim arteriolama potkožnog masnog tkiva pri dozama acetilkolina  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$ M.



\*  $P < 0.001$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

SAT - potkožno masno tkivo

VAT - visceralno masno tkivo

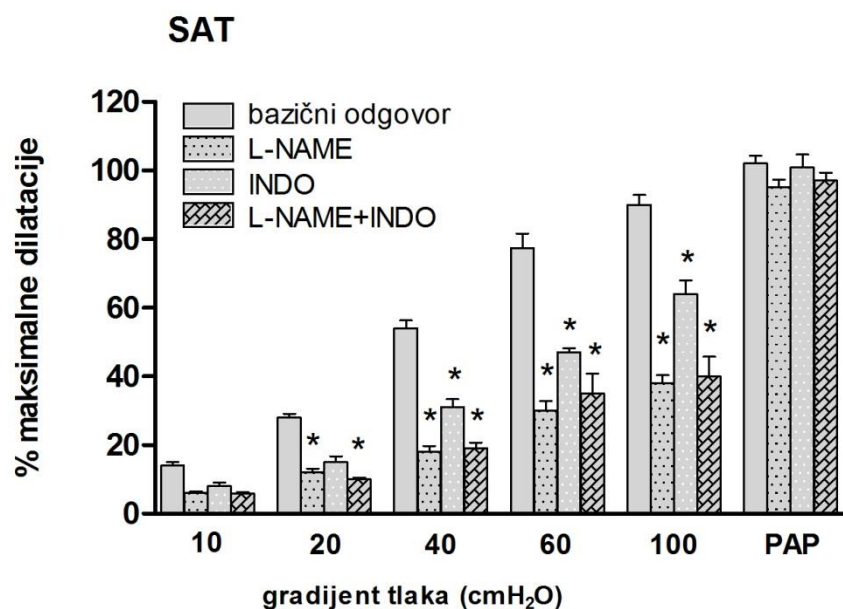
PAP - papaverin

**Slika 2. Bazični odgovor otporničkih arteriola potkožnog (SAT) i visceralnog (VAT) masnog tkiva na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID)**

Dilatacija na acetilkolin otporničkih krvnih žila potkožnog masnog tkiva je veća od dilatacije otporničkih krvnih žila visceralnog masnog tkiva pri dozama acetilkolina  $10^{-7}$  do  $10^{-4}$  M.

### 5.3. Učinak inhibicije NO sintetaze i ciklooksigenaze na protokom posredovanu dilataciju otporničkih arterija potkožnog i visceralnog masnog tkiva

U prisutnosti inhibitora NO sintetaze, L-NAME ( $10^{-4}$ M), značajno je smanjena protkom posredovana dilatacija otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva pri gradijentu tlaka  $\Delta 20$ ,  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  cmH<sub>2</sub>O. Inhibitor ciklooksigenaze, indometacin (INDO;  $10^{-4}$ M), značajno smanjuje protkom posredovanu dilataciju otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva pri gradijentu tlaka  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$ ,  $\Delta 100$  cmH<sub>2</sub>O ( $n = 10$ ;  $P < 0.001$ ). Zajednički učinak ovih dvaju inhibitora, L-NAME + INDO, na protokom posredovanu dilataciju otporničkih žila potkožnog masnog tkiva sličan je učinku samog L-NAME-a.



\*  $P < 0.001$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

SAT - potkožno masno tkivo

L-NAME - N-nitro-L-arginin metil ester

INDO - indometacin

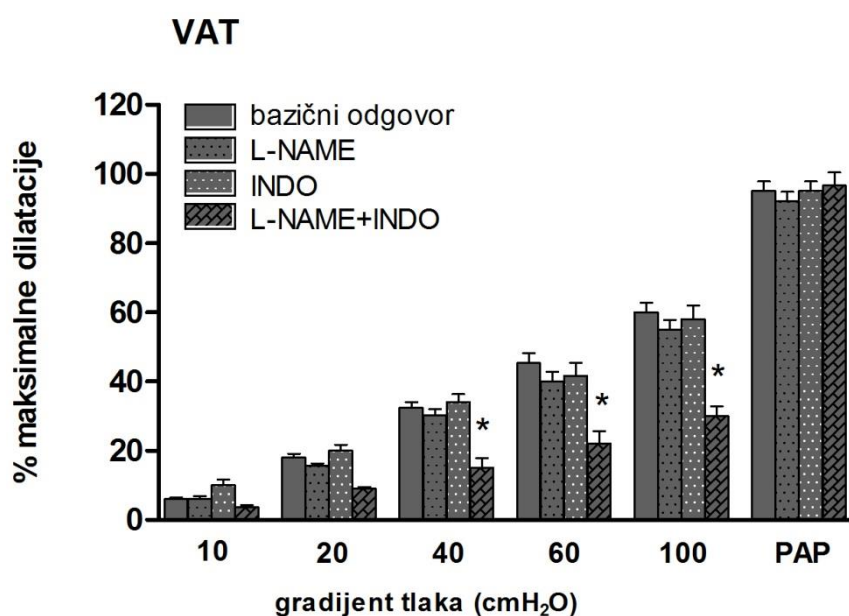
PAP - papaverin

**Slika 3. Učinak inhibicije NO sintetaze (NOS) i ciklooksigenaze (COX) na protkom posredovanu dilataciju (FID) otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva (SAT)**

L-NAME, inhibitor NO sintetaze, značajno smanjuje protkom posredovanu dilataciju otporničkih žila potkožnog masnog tkiva. Indometacin (INDO) smanjuje protkom

posredovanu dilataciju otporničkih žila potkožnog masnog tkiva, ali nema dodatni učinak u zajedničkoj prisutnosti s L-NAME-om.

L-NAME, inhibitor NO sintetaze ( $10^{-4}$ M), nema učinak na protkom posredovanu dilataciju otporničkih arterija visceralnog masnog tkiva uspoređujući ga s bazalnim odgovorom. Dok INDO (n=10) nema učinka na protkom posredovanu dilataciju otporničkih žila visceralnog masnog tkiva, zajednički učinak L-NAME-a i INDO-a je značajno smanjenje dilatacije pri gradijentu tlaka  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  cm H<sub>2</sub>O.



\*P<0.05 bazični odgovor vs. L-NAME+INDO  
 Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SEM  
 VAT - visceralno masno tkivo  
 L-NAME - N-nitro-L-arginin metil ester  
 INDO - indometacin  
 PAP - papaverin

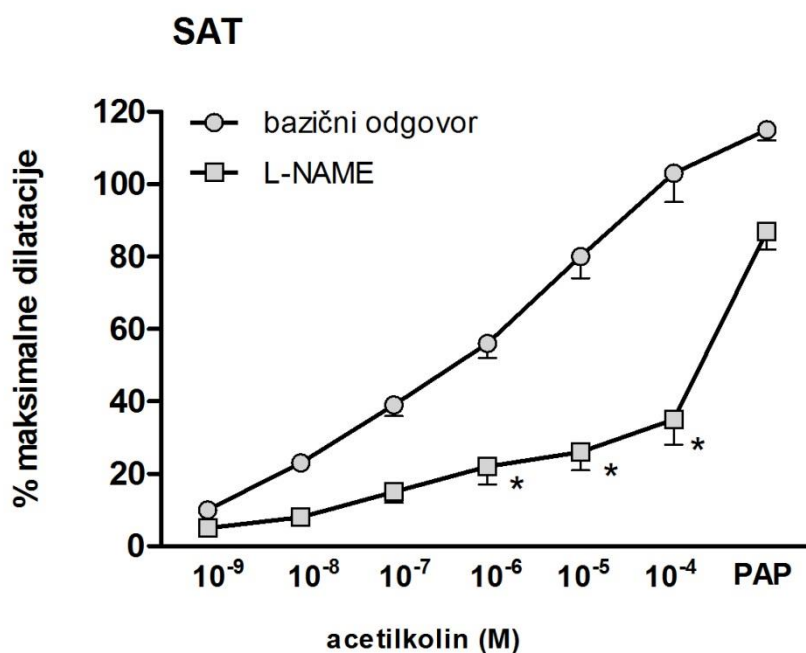
**Slika 4. Učinak inhibicije NO sintetaze (NOS) i ciklooksigenaze (COX) na protkom posredovanu dilataciju (FID) otporničkih arterija visceralnog masnog tkiva (VAT)**

L-NAME, inhibitor NO sintetaze, kao i INDO, inhibitor ciklooksigenaze, nema učinka na protkom posredovanu dilataciju otporničkih žila visceralnog masnog tkiva, dok dodani zajedno L-NAME i INDO smanjuju dilataciju pri višim vrijednostima protoka.

#### 5.4. Učinak inhibicije NO sintetaze i ciklooksigenaze na acetilkolinom posredovanu dilataciju otporničkih arterija potkožnog i visceralnog masnog tkiva

U prisutnosti inhibitora L-NAME-a značajno je smanjena acetilkolinom posredovana dilatacija otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva pri dozama acetilkolina  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$ M ( $P < 0.01$ ,  $n=10$ ), dok kod otporničkih arterija visceralnog masnog tkiva nije nađeno značajno smanjanje uspoređujući ga s bazičnim odgovorom. Između otporničkih arteriola potkožnog i visceralnog masnog tkiva nije dobivena razlika u acetilkolinom posredovanoj dilataciji u prisutnosti L-NAME-a.

Acetilkolinom potaknuta dilatacija SAT otpornički žila ( $n=9$ ) smanjena je u prisutnosti neselektivog inhibitora COX-1 i COX-2 indometacina (INDO) uspoređujući ju s bazičnim odgovorom pri dozama acetilkolina  $10^{-7}$  do  $10^{-4}$ M ( $P < 0.05$ ), dok INDO nema učinka na acetilkolinom potaknutu dilataciju u VAT ( $n=9$ ) otporničkim žilama uspoređujući ju s bazičnim odgovorom.



\*  $P < 0.01$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

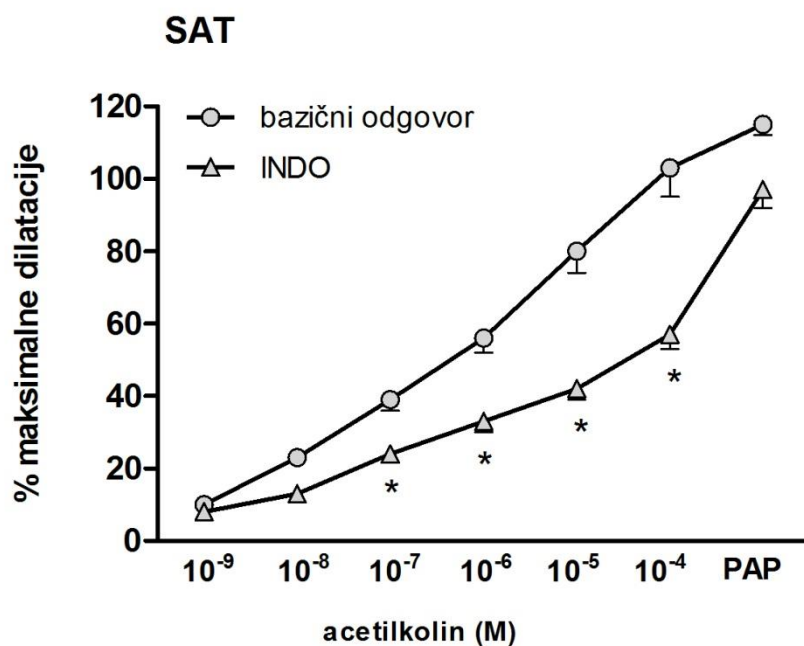
SAT - potkožno masno tkivo

L-NAME - N-nitro-L-arginin metil ester

PAP - papaverin

**Slika 5. Učinak inhibicije NO sintetaze (NOS) na protkom posredovanu dilataciju (AChID) otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva (SAT)**

L-NAME, inhibitor NO-sintaze, značajno smanjuje acetilkolinom posredovanu dilataciju otporničkih žila potkožnog masnog tkiva pri dozama acetilkolina  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  i  $10^{-4}$ M.



\* P<0.05

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SEM

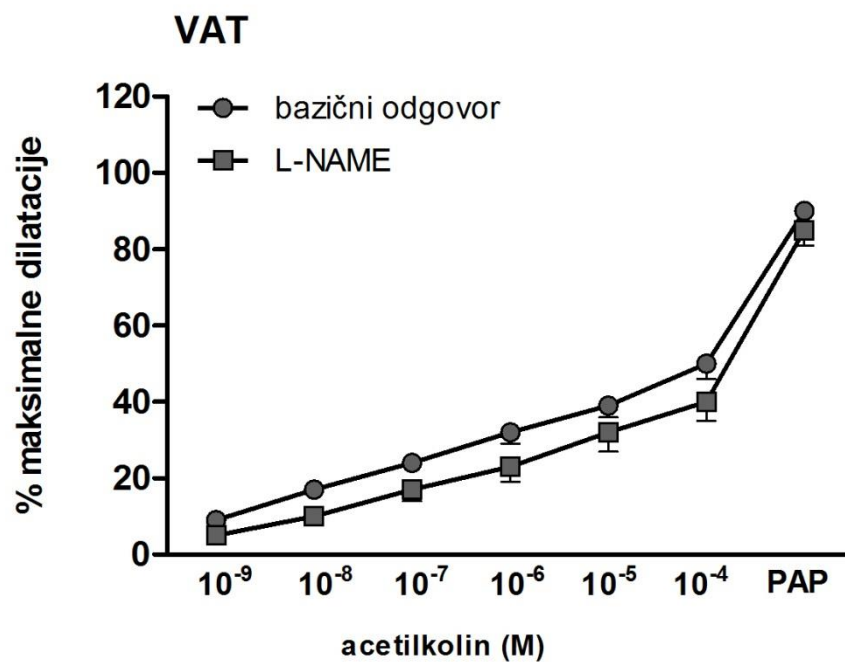
SAT - potkožno masno tkivo

INDO - indometacin

PAP - papaverin

**Slika 6. Učinak inhibicije ciklooksigenaze (COX) na acetilkolinom posredovanu dilataciju (AChID) otporničkih arterija potkožnog masnog tkiva (SAT)**

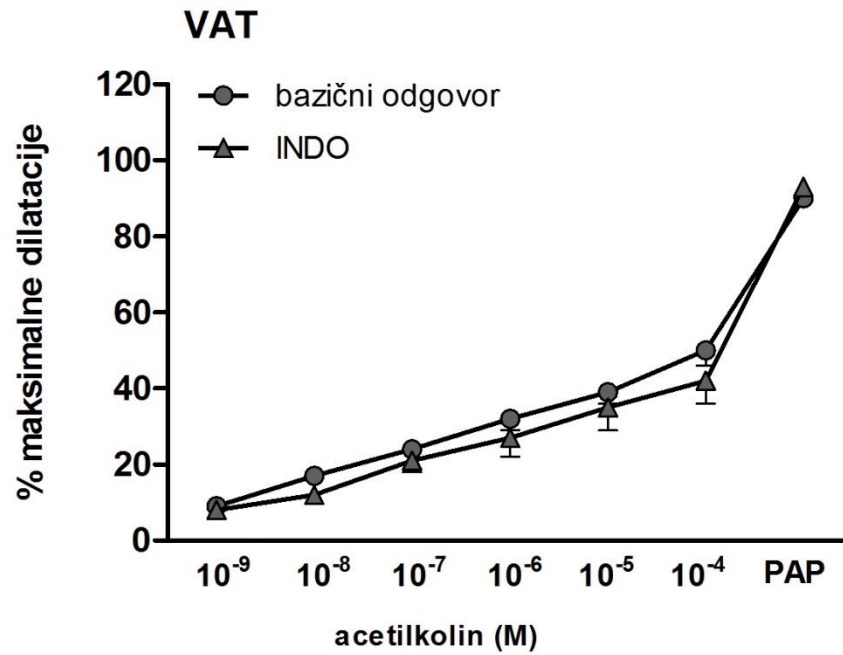
Indometacin, neselektivni inhibitor COX-a, smanjuje acetilkolinom posredovanu dilataciju otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva pri dozama acetilkolina  $10^{-7}$ – $10^{-4}$ M.



Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SEM  
 VAT - visceralno masno tkivo  
 L-NAME - N-nitro-L-arginin metil ester  
 PAP - papaverin

**Slika 7. Učinak inhibicije NO sintetaze (NOS) na acetilkolinom posredovanu dilataciju (AChID) otporničkih arterija visceralnog masnog tkiva (VAT)**

Inhibitor NO-sintetaze, L-NAME, nema učinka na acetilkolinom posredovanu dilataciju otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva uspoređujući ga s bazičnim odgovorom.



Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SEM  
 VAT - visceralno masno tkivo  
 INDO - indometacin  
 PAP - papaverin

**Slika 8. Učinak inhibicije ciklooksigenaze (COX) na acetilkolinom posredovanu dilataciju (AChID) otporničkih arterija visceralnog masnog tkiva (VAT)**

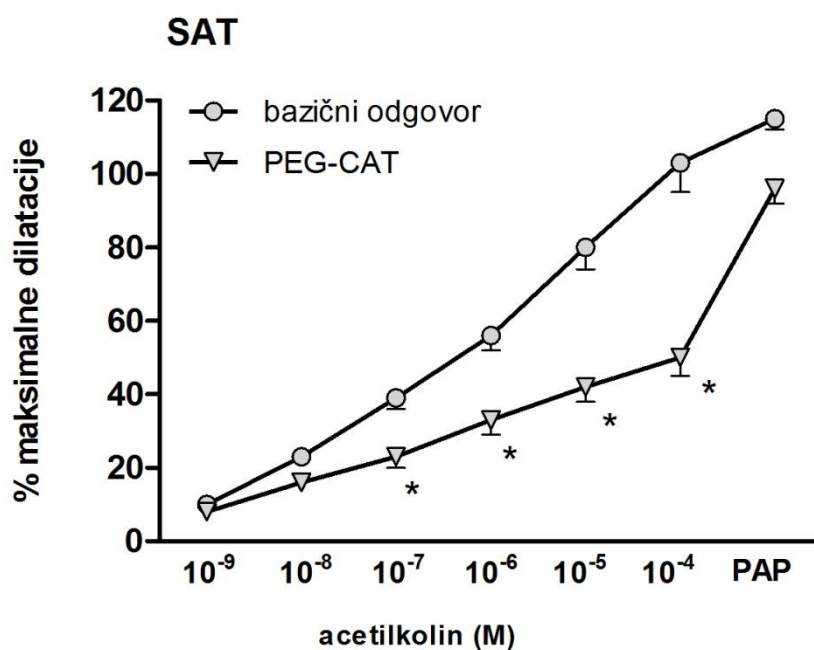
Indometacin, neselektivni inhibitor COX-a, nema učinka na acetilkolinom posredovanu dilataciju otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva.



### 5.5. Učinak PEG-katalaze na acetilkolinom potaknutu dilataciju otporničkih arteriola potkožnog i visceralnog masnog tkiva

Polietilenglikol katalaza, PEG-CAT, značajno smanjuje acetilkolinom potaknutu dilataciju uspoređujući ju s bazalnim odgovorom kod otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva ( $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ) pri dozama acetilkolina  $10^{-7}$ - $10^{-4}$ M.

Inkubacija otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva s PEG-CAT nije mijenjala acetilkolinom potaknutu vazodilataciju uspoređujući ju s bazalnim odgovorom.



\*  $P < 0.05$

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  SEM

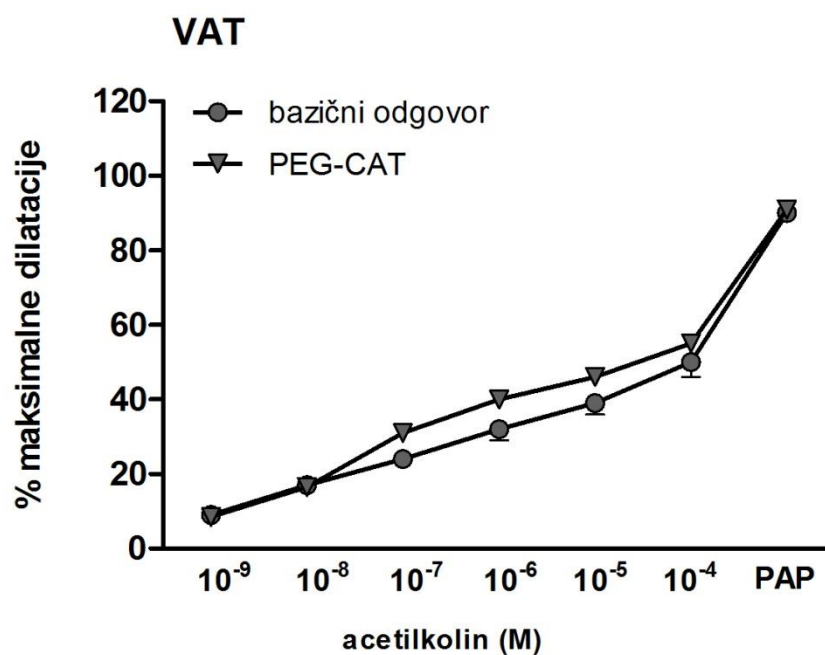
SAT - potkožno masno tkivo

PEG-CAT - poli etilenglikol katalaza

PAP - papaverin

**Slika 9. Učinak polietilenglikol katalaze (PEG-CAT) na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID) otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva (SAT)**

U prisutnosti PEG-CAT, acetilkolinom potaknuta dilatacija otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva smanjena je pri dozama acetilkolina  $10^{-7}$ - $10^{-4}$ M.



Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SEM

VAT - visceralno masno tkivo

PEG-CAT - poli etilenglikol katalaza

PAP - papaverin

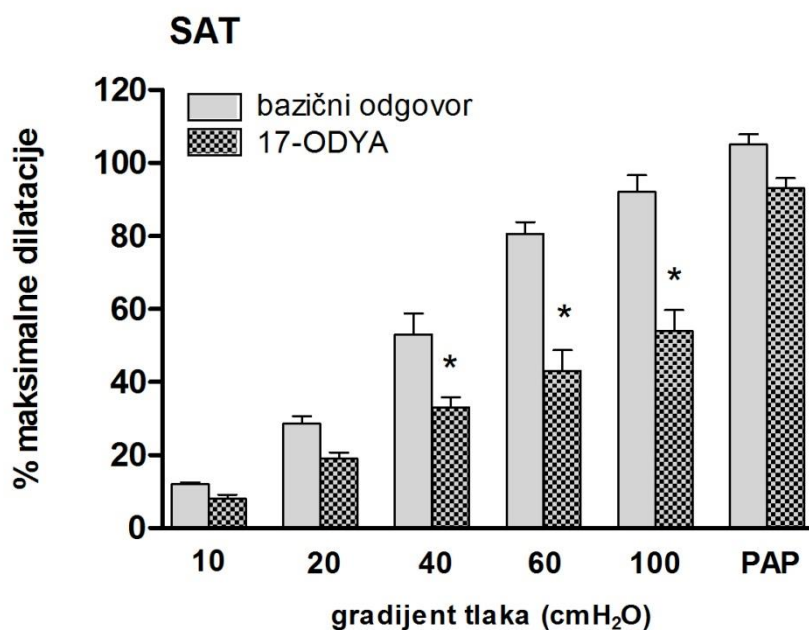
**Slika 10. Učinak polietilenglikol katalaze (PEG-CAT) na acetilkolinom potaknutu dilataciju (AChID) otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva (VAT)**

PEG-CAT nema učinka na acetilkolinom potaknutu dilataciju otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva.

## 5.6. Učinak inhibicije metabolizma citokroma P450 i učinak PEG-katalaze na protokom potaknutu dilataciju otporničkih arteriola potkožnog i visceralnog masnog tkiva

Inhibicija citokroma P450 s 17-octadecynoic acid (17-ODYA) smanjuje protokom potaknutu dilataciju otporničkih krvnih žila potkožnog masnog tkiva pri gradijentu tlaka od  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  cmH<sub>2</sub>O (n = 10; P<0.01), te otporničkih žila visceralnog masnog tkiva (n = 12; P<0.001), pri gradijentu tlaka  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  cmH<sub>2</sub>O, uspoređujući ju s bazičnim odgovorom.

PEG-CAT značajno smanjuje protokom potaknutu dilataciju otporničkih krvnih žila potkožnog masnog tkiva pri gradijentu tlaka od  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  cmH<sub>2</sub>O, uspoređujući ju s bazičnim odgovorom (n = 8; P<0.01), ali nema učinka kod otporničkih žila visceralnog masnog tkiva.



\* P<0.01

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SEM

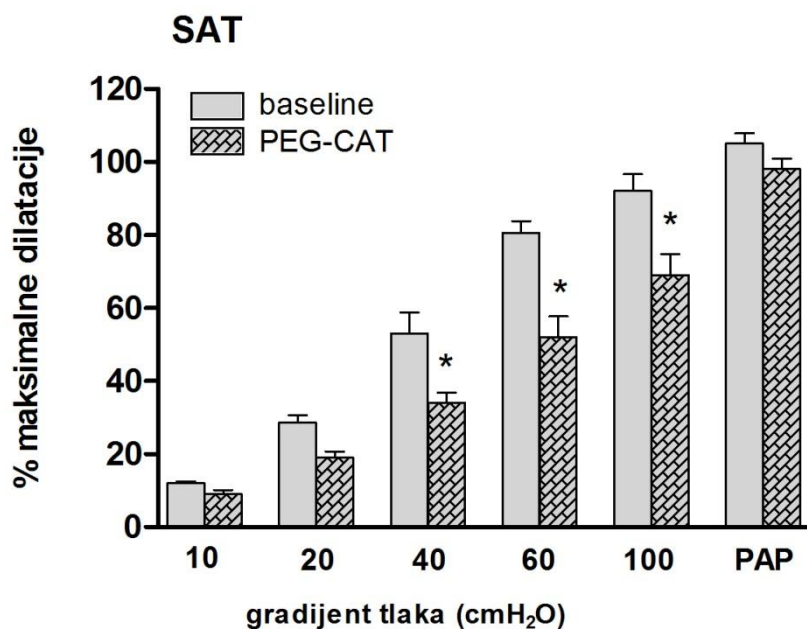
SAT - potkožno masno tkivo

17-ODYA - 17-octadecynoic acid

PAP - papaverin

**Slika 11. Učinak inhibicije metabolizma citokroma P450 na protokom potaknutu dilataciju (FID) otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva (SAT)**

U prisutnosti inhibitora metabolizma citokroma P450, 17-ODYA, smanjena je protokom potaknuta dilatacija otporničkih žila potkožnog masnog tkiva, uspoređujući ju s bazičnim odgovorom.



\* P<0.01

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SEM

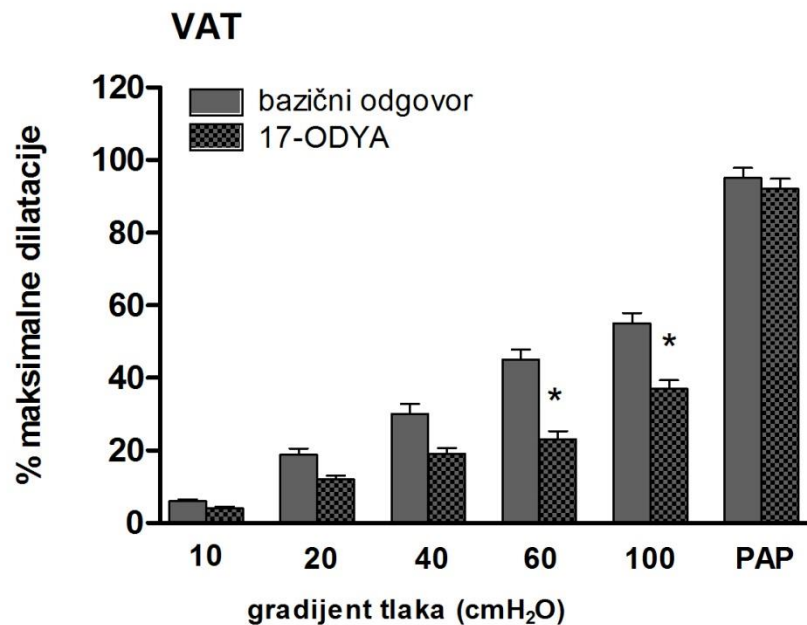
SAT - potkožno masno tkivo

PEG-CAT - poli etilenglikol katalaza

PAP - papaverine

**Slika 12. Učinak polietilenglikol katalaze (PEG-CAT) na protokom potaknutu dilataciju (FID) otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva (SAT)**

U prisutnosti PEG-CAT, protokom potaknuta dilatacija otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva značajano je smanjena uspoređujući ju s bazičnim odgovorom, pri gradijentu tlaka  $\Delta 40$ ,  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  cmH<sub>2</sub>O.



\* P<0.001

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SEM

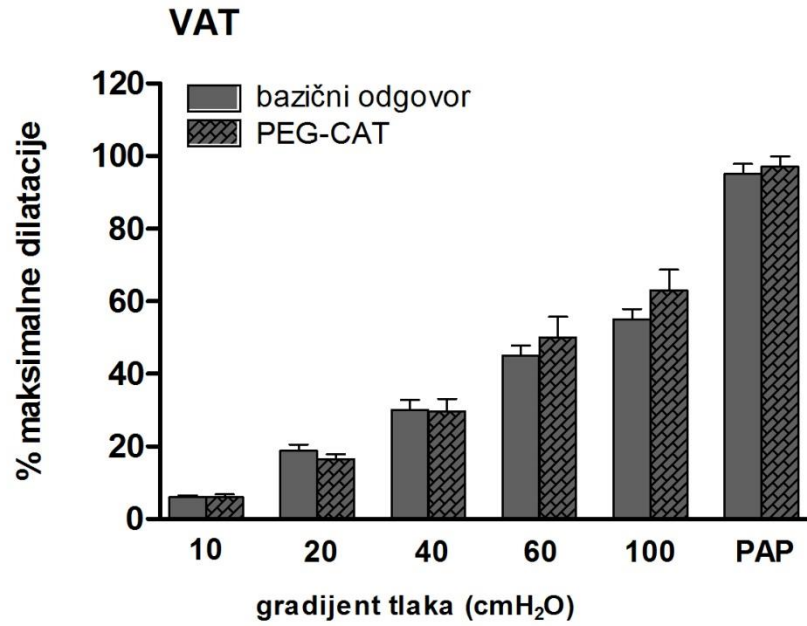
VAT - visceralno masno tkivo

17-ODYA - 17-octadecynoic acid

PAP - papaverin

**Slika 13. Učinak inhibicije metabolizma citokroma P450 na protokom potaknutu dilataciju (FID) otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva (VAT)**

U prisutnosti inhibitora metabolizma citokroma P450, 17-ODYA, smanjena je protokom potaknuta dilatacija otporničkih žila visceralnom masnog tkiva uspoređujući ju s bazičnim odgovorom, pri gradijentu tlaka  $\Delta 60$  i  $\Delta 100$  cmH<sub>2</sub>O.



\* P<0.05

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SEM

VAT - visceralno masno tkivo

PEG-CAT - poli etileneglikol katalaza

PAP - papaverin

***Slika 14. Učinak polietilenglikol katalaze (PEG-CAT) na protokom potaknutu dilataciju (FID) otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva (VAT)***

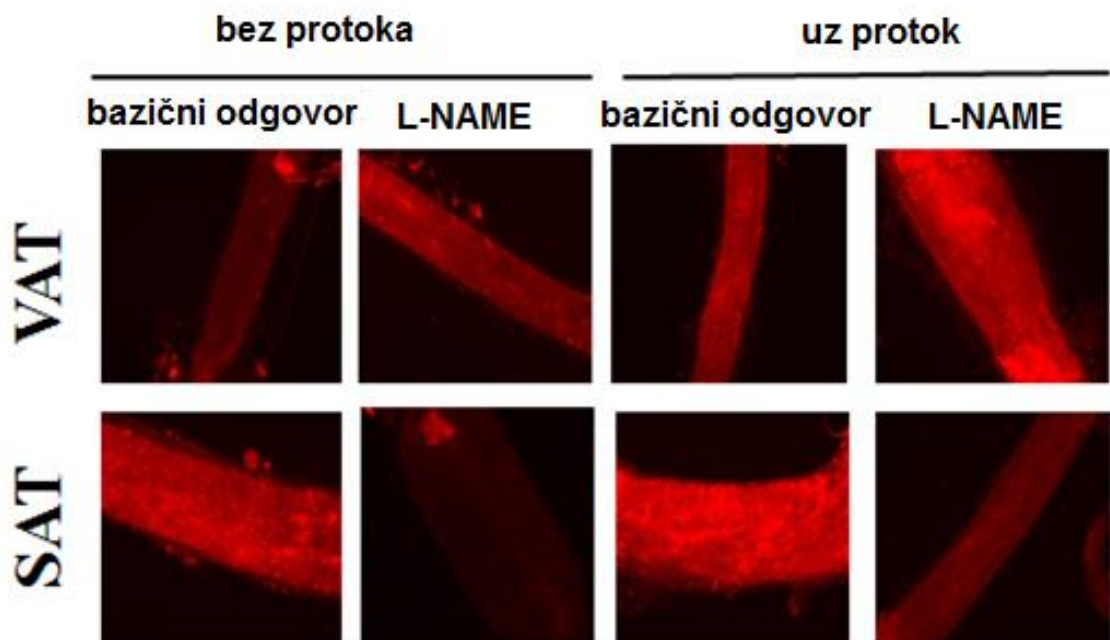
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sakupljač, PEG-CAT, nema učinka na protokom potaknutu dilataciju otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva.

### 5.7. Određivanje stanične proizvodnje NO-a i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u otporničkim arteriolama potkožnog i visceralnog masnog tkiva

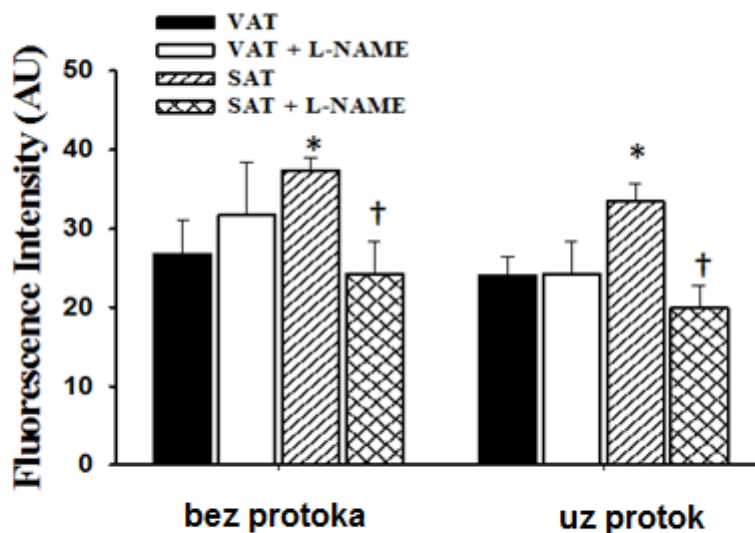
U otporničkim arteriolama potkožnog i visceralnog masnog tkiva određivana je stanična proizvodnja NO-a i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> korištenjem fluorescentnog mikroskopa. Proizvodnja je određivana u odsutnosti i prisutnosti protoka (intraluminalni gradijent tlaka od 60 cm H<sub>2</sub>O), te s i bez korištenja inhibitora NOS-a, L-NAME-a (10<sup>-4</sup>M).

Proizvodnja NO-a je smanjena u otporničkim žilama visceralnog masnog tkiva uspoređujući ju s potkožnim u stanju bez protoka (n=6 u svakoj grupi, P<0.05). L-NAME smanjuje proizvodnju NO-a u žilama potkožnog masnog tkiva (P<0.001 uspoređujući bez L-NAME-a) prije i nakon uspostavljanja intraluminalnog protoka. Učinak L-NAME-a na proizvodnju NO-a u krvnim žilama visceralnom masnog tkiva nije uočen.

A)



B)



*Slika 15. Proizvodnja dušikovog oksid (NO) u otporničkim arteriolama visceralnog (VAT) i potkožnog (SAT) masnog tkiva u prisutnosti i odsutnosti protoka, prije i nakon inkubacije s L-NAME-om*

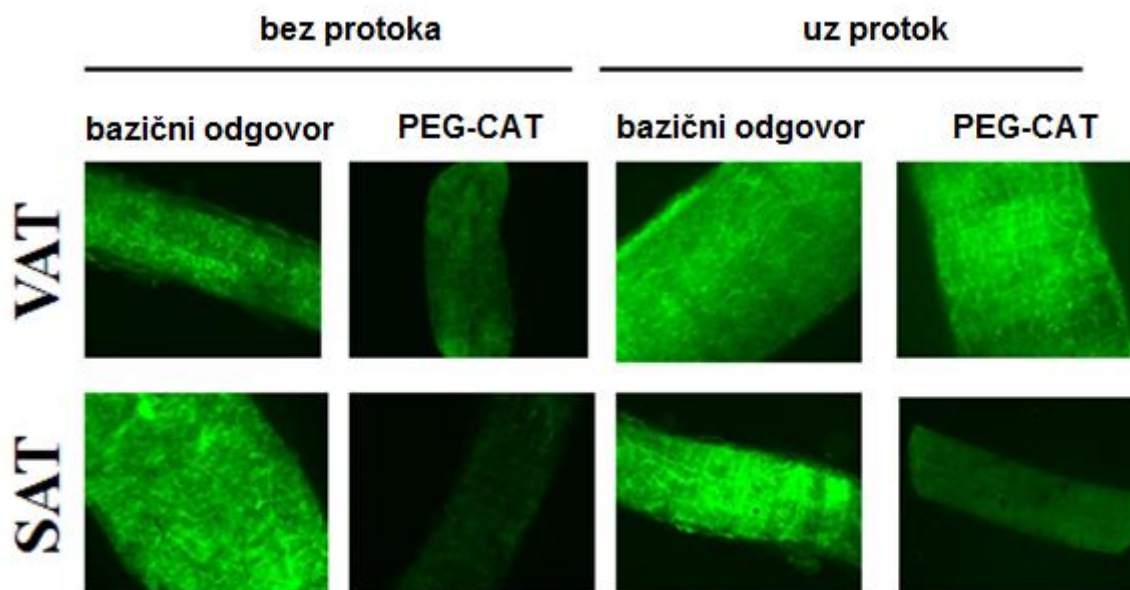
Primjenom metode imunofluorescentne mikroskopije određivana je stanična proizvodnja NO-a. Proizvodnja NO-a je povećana u otporničkim žilama potkožnog masnog tkiva u usporedbi s žilama visceralnog masnog tkiva, u stanju bez intraluminalnog protoka. L-NAME smanjuje proizvodnju NO-a u otporničkim žilama potkožnog masnog tkiva, ali ne i otporničkim žilama visceralnog masnog tkiva (Slika 15A). Slika 15B prikazuje sažete podatke intenziteta fluorescencije u otporničkim žilama potkožnog i visceralnog masnog tkiva. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM. \*P<0.05 u odnosu na visceralno tkivo bez protoka. †P<0.05 u odnosu na bazični odgovor bez L-NAME-a.



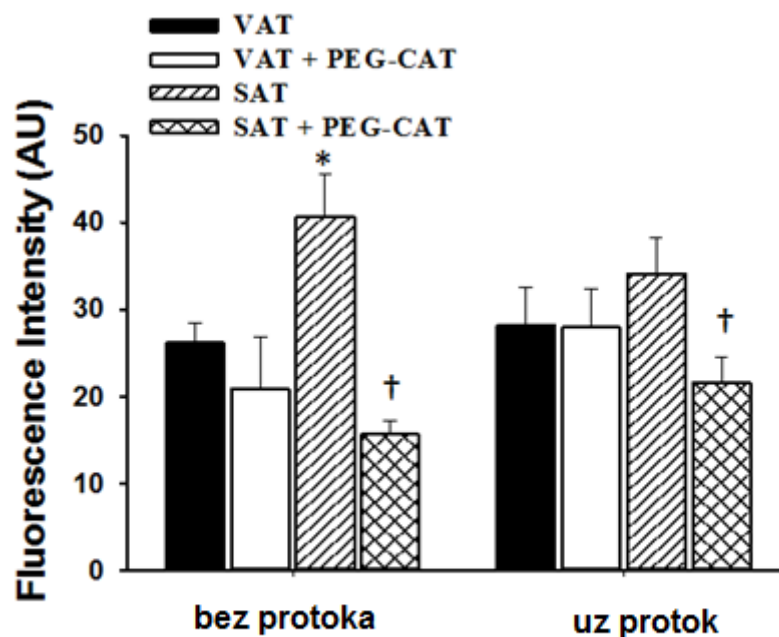
Slike 16A i 16B prikazuju proizvodnju  $H_2O_2$  u otporničkim žilama visceralnog i potkožnog masnog tkiva kod pretilih osoba koristeći metodu fluorescentne mikroskopije. Proizvodnja je određivana u odsutnosti i prisutnosti protoka kroz žilu (intraluminalni gradijent tlaka od 60 cm  $H_2O$ ), s i bez korištenja sakupljača  $H_2O_2$ , PEG-katalaze (PEG-CAT; 500 U/ml).

Za vrijeme intraluminalnog protoka, PEG-katalaza značajno smanjuje DCF fluorescenciju u rezistentnim krvnim žilama potkožnog masnog tkiva ( $P=0.04$ ), ali ne i u rezistentnim žilama visceralnog masnog tkiva ( $P=0.1$ ). Nije zabilježen značajan učinak intraluminalnog protoka na proizvodnju  $H_2O_2$  u usporebi s bazičnim odgovorom ( $P=0.6$ ).

A)



B)

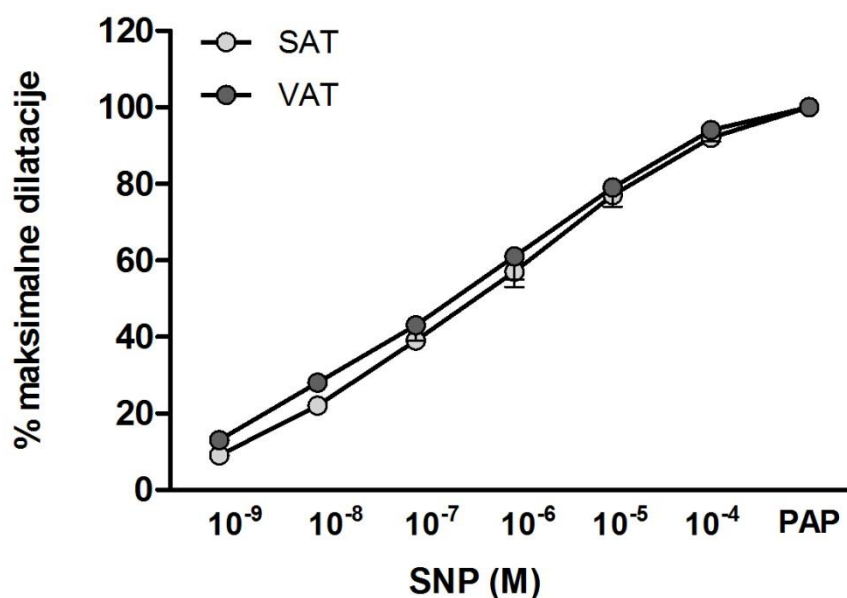


*Slika 16. Proizvodnja vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) u otporničkim arteriolama visceralnog (VAT) i potkožnog (SAT) masnog tkiva u prisutnosti i odsutnosti protoka, prije i nakon inkubacije s PEG-katalazom*

Primjenom metode imunofluorescentne mikroskopije određivana je stanična proizvodnja NO-a i  $H_2O_2$ . U prisutnosti intraluminalnog protoka, PEG-katalaza značajno smanjuje DCF fluorescenciju otporničkih žila potkožnog masnog tkiva, ali ne i otporničkih žila visceralnog masnog tkiva. Nije pronađen učinak intraluminalnog protoka na proizvodnju  $H_2O_2$  uspoređujući ga s bazičnim odgovorom. PEG-katalaza nije mijenjala DCF fluorescenciju bazičnog odgovora. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$  u odnosu na bazičan odgovor bez PEG-CAT (Slika 16A). Slika 16B prikazuje sažete podatke prikazujući intenzitet fluorescencije u otporničkim žilama potkožnog i visceralnog masnog tkiva. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost $\pm$ SEM. \* $P < 0.05$  u odnosu na visceralno tkivo bez protoka. † $P < 0.01$  u odnosu na bazični odgovor bez PEG-katalaze.

### 5.8. O endotelu neovisna dilatacija otporničkih arteriola potkožnog (SAT) i visceralnog (VAT) masnog tkiva u odgovoru na natrijev nitroprusid (SNP)

Slika 17 prikazuje krivulju odgovora otporničkih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva na pojedine doze o endotelu neovisnog, izravnog donora NO-a, natrijevog nitroprusida (SNP). Vazodilatacija u odgovoru na SNP je očuvana kod otporničkih žila i potkožnog i visceralnog masnog tkiva, i među njma nema značajne razlike u odgovoru (n=10 u obje skupine).



Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SEM  
SAT - potkožno masno tkivo  
VAT - visceralno masno tkivo  
SNP - natrijev nitroprusid  
PAP - papaverin

**Slika 17. O endotelu neovisna dilatacija otporničkih arteriola potkožnog (SAT) i visceralnog (VAT) masnog tkiva u odgovoru na natrijev nitroprusid (SNP)**

Otporničke žile potkožnog i visceralnog masnog tkiva dilatiraju se na SNP, izražavaju endotel-neovisnu dilataciju, te među njma nema statistički značajne razlike.

## 6. RASPRAVA

Glavni rezultati ovog istraživanja su da 1) otporničke krvne žile visceralnog masnog tkiva pokazuju smanjenu osjetljivost na o endotelu ovisne podražaje poput protoka ili acetilkolina, uspoređujući ih s otporničkim žilama potkožnog masnog tkiva kod morbidno pretilih žena; 2) L-NAME, INDO i PEG-CAT smanjuju protokom potaknu dilataciju otporničkih žila potkožnog masnog tkiva, ali ne i otporničkih žila visceralnog masnog tkiva pretilih žena; 3) inhibitor metabolizma citokroma P450, 17-ODYA, smanjuje protkom potaknutu dilataciju otpornički žila i potkožnog i visceralnog masnog tkiva; 4) bazična i protkom potaknuta proizvodnja NO-a je smanjena u otporničkim žilama visceralnog masnog tkiva uspoređujući s otporničkim žilama potkožnog masnog tkiva; i 5) o endotelu neovisna dilatacija očuvana je i približno jednaka u otpornički arteriolama potkožnog i visceralnog masnog tkiva što je dokaz da su sve dobivene promjene na razini endotela.

Ovo je prva studija iz područja ljudske pretilosti koja pokazuje smanjenu vazodilatatornu osjetljivost na protok visceralnog masnog tkiva u odnosu na potkožno masno tkivo. Prema našim saznanjima, ovo je prva studija koja pokazuje da je, osim vaskularnog odgovora arteriola na acetilkolin, vaskularni odgovor visceralnog masnog tkiva na protok također smanjen u odnosu na potkožno masno tkivo kod pretilih osoba. Rezultati naše studije konzistentni su s ranijim spoznajama endotelne disfunkcije u stanjima pretilosti (101,165,173,185,189). Kako bismo isključili moguće nusnalaze, u naše istraživanje bile su uključene pretilе žene bez povijesti postojanja dijabetesa te akutne ili kronične upalne bolesti, osim pretilosti. Nadalje, većina naših ispitanica bile su normotenzivne te urednih nalaza lipida. Dakle, vaskularne promjene nađene u ovoj studiji ističu jedinstven utjecaj teške pretilosti *per se* na vaskularnu reaktivnost krvnih žila.

### 6.1. Odnos visceralnog masnog tkiva i endotelne disfunkcije

Prevalencija pretilosti je u neprestanom porastu u svim dobnim skupinama širom svijeta (112). Pretilost predstavlja neovisan rizični čimbenik kardiovaskularnih bolesti (114), iako mehanizmi koji povezuju pretilost s rizikom nastanka kardiovaskularnih bolesti još uvijek nisu u potpunosti jasni. Nedavna istraživanja ukazuju na to da je nakupljanje masnog tkiva, koje se i događa u pretilosti, karakterizirano stalno prisutnom kroničnom upalom niskog stupnja kao i izlučivanjem upalnih citokina i kemokina (113). Posrednici povezani s

kroničnom upalom imaju ključnu ulogu u patogenezi ateroskleroze (114), pa bi tako upala prisutna u masnom tkivu mogla biti poveznica između pretilosti i kardiovaskularnih bolesti. Masno je tkivo predloženo kao izvor endokrine i parakrine modulacije vaskularne funkcije u pretilosti i stoga bi krvne žile masnog tkiva mogle služiti kao "stražari" izmijenjene endotelne funkcije uzrokovane kroničnom upalom niskog stupnja (176,177). Kod pretilih osoba endotelna disfunkcija dovodi do neravnoteže između vazodilatacije i vazokonstrikcije u korist vazokonstrikcije. Međutim, u pretilosti se čini da postoji sveopće oštećenje endotelne funkcije, kako u velikim krvnim žilama, tako i u mikrovaskulaturi (176). Pokazano je da povišena razina cirkulirajućih slobodnih masnih kiselina i upalnih posrednika oštećuje aktivaciju eNOS-a i na taj način smanjuje proizvodnju NO-a i o NO-u ovisnu vazodilataciju (177,188).

Osim strukturnih promjena, čini se da mjesto skladišta masnog tkiva ima ključnu ulogu u težini metaboličkog oštećenja. Visceralno se masno tkivo obično smatra najaktivnijim skladištem masnog tkiva koji potiče sistemsku upalu u stanjima pretilosti (161) i stoga je uže povezano s nastankom kardiovaskularnih bolesti nego ukupno tjelesno masno tkivo (162,163). Nedavne studije koje istražuju povezanost između pretilosti i vaskularne funkcije pokazuju da je visceralno masno tkivo povezano s oštećenjem endotelne funkcije i povećanom krutošću velikih arterija (166, 193). U ovom istraživanju masnog tkiva morbidno pretilih žena pokazali smo kako ljudske arteriole izolirane iz visceralnog masnog tkiva omentuma imaju oštećenu o endotelu ovisnu dilataciju u usporedbi s krvnim žilama potkožnog masnog tkiva (Slike 1 i 2). Romero-Corral i suradnici su pokazali da je i umjerena količina masnog tkiva dobivena od zdravih osoba normalne tjelesne težine povezana s endotelnom disfunkcijom i za to je odgovorna povećana količina visceralnog masnog tkiva (163). Sukladno s našom studijom, prethodne studije pokazuju oštećenje o endotelu ovisne acetilkolinom potaknute, vazodilatacije arteriola visceralnog masnog tkiva, uspoređujući ju s potkožnim (189). Neke druge studije pokazuju da proupalno stanje i pridruženi oksidativni stres, koji prate debljinu, mijenjaju vaskularnu funkciju narušavajući ravnotežu između vazokonstriktornih i vazodilatatornih posrednika (194). Kako bi se razjasnila moguća jedinstvena uloga različitih skladišta masnog tkiva kod pretilih osoba, potkožnog i visceralnog, nastojali smo odrediti mehanizme protokom i acetilkolinom potaknute dilatacije u ta dva različita skladišta masnog tkiva u pretilosti.

## 6.2. Mehanizmi vazodilatacije u masnom tkivu

Struktura endotelnih stanica, kao i njihov funkcionalni integritet, su važni u održavanju zida krvne žile i njegove funkcije, što ukazuje na to da endotel nikako nije inertan. Endotelne su stanice vrlo dinamične i imaju metaboličku i sintetsku ulogu (2,4). Rezultati naše studije pokazuju da je protokom posredovana (*shear stressom* potaknuta) i acetilkolinom posredovana vazodilatacija postojeća u mikrovaskulaturi pretilih žena. Kada su arteriole dobivene iz bioptata masnog tkiva pretilih žena podvrgnute progresivnom povećanju protoka, došlo je do povećanja promjera krvnih žila, koje je očito izravno povezano s protokom. Ovaj je odgovor, kao i onaj potaknut acetilkolinom, ovisan o postojanosti integriteta endotela mikrovaskulature; kada se ukloni endotel, protokom i acetilkolinom posredovana vazodilatacija nestaje (76,92). Prethodne su studije pokazale da porast protoka kroz žile potiče o endotelu ovisnu dilataciju velikih provodničkih arterija (44,77). Rezultati naše studije pružaju izravne dokaze da protokom posredovan porast žilnog stresa također potiče o endotelu ovisnu vazodilataciju u ljudskoj mikrovaskulaturi. S obzirom na to da krvne žile određuju vaskularnu otpornost i time utječu na protok krvi, ovaj fenomen može imati fiziološku važnost za regulaciju lokalne prokrvljenosti i održavanje sistemskog vaskularnog tonusa.

S obzirom na njihovu lokaciju endotelne su stanice stalno izložene vrlo promjenjivom okolišu i odgovaraju, ne samo na humoralne čimbenike u cirkulaciji, već i na mehaničke uvjete uzokovane krvnim protokom i srčanim ciklusom. Hemodinamski uvjeti unutar krvne žile dovode do nastanka površinskog naprezanja u blizini stijenke krvne žile; cirkumferentni pritisak zbog promjenljivog tlaka unutar žile i sila smicanja zbog protoka krvi. Sila smicanja predstavlja silu po jedinici površine koju stvara tangencijalna sila protoka krvi na endotelne stanice. Dolazi do poticanja pretvorbe mehaničke sile u biokemijski odgovor, aktivacije prijenosa signala i o endotelu ovisne genske i proteinske ekspresije koja određuje fenotip endotelne stanice (25). Endotel je vrlo dinamično tkivo koje ima ključnu ulogu u vaskularnoj funkciji i održavanju vaskularnog zdravlja. Njegove glavne uloge uključuju održavanje protoka krvi i njene fluidnosti, kontrolu nad koagulacijom i upalnim odgovorima, te regulaciju vaskularnog tonusa (2,4). Zbog toga što endotelna regulacija vaskularnog tonusa podrazumijeva otpuštanje nekoliko posrednika (2), vrlo je važno odrediti koji od njih posreduje stvaran odgovor.

### **6.2.1. Uloga metabolita arahidonske kiseline u vaskularnom odgovoru krvnih žila masnog tkiva**

NO se neprekinuto proizvodi i otpušta iz endotelnih stanica kako bi uzrokovao vazodilataciju podražujući gvanilat ciklazu u mišićnim stanicama stijenke krvnih žila (20-23). S obzirom na značaj NO-a u održavanju tonusa krvnih žila (19), pretpostavili smo da je ova molekula također odgovorna i za protokom posredovanu vazodilataciju u ljudskoj mikrovaskulaturi i naša opažanja ukazuju na to da je NO doista uveliko odgovoran za dilataciju malih krvnih žila potaknutu žilnim stresom. Inkubacija krvne žile s L-NAME-om (antagonistom NO sintetaze) značajno slabi protokom posredovanu dilataciju (Slike 3 i 4). Ovi su rezultati u skladu s dobivenima u istraživanjima na animalnim modelima krvnih žila (71) i rezultatima *in vivo* istraživanja velikih provodnih ljudskih aretrija (44).

Moguće je da se kod pretilosti događaju i promjene u vaskularnoj proizvodnji prostaglandina. Endotelna proizvodnja superoksidnog aniona doprinosi povećanju ekspresije COX-a (195). Vezu između NO-a i metabolita COX-a su predložili Salvemini i njegovi suradnici kada su pokazali kako je povećano otpuštanje prostaglandina bilo ovisno o NO-u (196). Metabolitni put ciklooksigenaza može biti pojačano regulirana nakon neprekidne inhibicije NOS-a (197,198), što ukazuje na to da bi PGI<sub>2</sub> mogao nadoknaditi manjak NO-a. Rezultati naše studije pokazuju da metaboliti COX-a sudjeluju u mehanizmima protokom i acetilkolinom potaknute dilatacije (Slike 3 i 6) u otporničkim žilama potkožnog masnog tkiva.

Povećanje protoka i posljedično povećanje sile žilnog stresa na endotelne stanice, povećava ekspresiju i aktivnost eNOS-a, odnosno otpuštanje EDRF-a/NO-a (22). Fiziološki, žilni stres ima ključnu ulogu u održavanju vaskularnog tonusa i vaskularnoj homeostazi te doprinosi održavanju tkivne perfuzije i vaskularnog integriteta. Posrednici protokom potaknute dilatacije ovise o vrsti krvne žile, no uglavnom uključuju otpuštanje NO-a, PGI<sub>2</sub> i/ili EDHF, koji su uglavnom derivati arahidonske kiseline ili su neki od ROS-a (79-82). U svojoj su studiji Phillips i suradnici dokazali da je odgovor visceralnog masnog tkiva na protok ovisan o NOS-u (79), i to je ujedno prva studija koja pokazuje NO-om posredovanu protokom potaknutu dilataciju u izoliranoj mikrocirkulaciji masnog tkiva. Međutim, mehanizam protokom potaknute dilatacije još nije bio istraživan u krvnim žilama masnog tkiva pretilih osoba. U našoj smo studiji pokazali da je vazodilatorna osjetljivost na protok smanjena u otporničkim žilama visceralnog masnog tkiva uspoređujući ju s potkožnim

masnim tkivom, kao i da je taj mehanizam vazodilatacije krvnih žila potkožnog (ali ne i visceralnog) masnog tkiva uglavnom ovisan o NO-u kod pretilih žena.

### **6.2.2. Uloga slobodnih kisikovih radikala u vaskularnom odgovoru krvnih žila masnog tkiva**

Studije na animalnim modelima su izvijestile kako je doprinos NO-a u mehanizmu protokom potaknute dilatacije smanjen kako se povećava oksidativni stres u uvjetima postojanja rizičnih čimbenika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, kao što su hiperkolesterolemija (78) i hipertenzija (73). Humana *in vivo* i *in vitro* istraživanja su pokazala kako čimbenici relaksacije, osim NO-a, kompenziraju održavanje protokom potaknute dilatacije u uvjetima smanjene dostupnosti NO-a (76). Rezultati naše studije pokazuju kako  $H_2O_2$  sudjeluje u mehanizmima acetilkolinom i protokom potaknute dilatacije otporničkih žila potkožnog masnog tkiva (Slike 9 i 12), dok metaboliti citokroma P450 djelomično doprinose mehanizmima protokom potaknute dilatacije otporničkih žila i potkožnog i visceralnog masnog tkiva (Slike 11 i 13).

Izmijenjan protokom potaknuta dilatacija znak je razvoja kardiovaskularnih bolesti i početni je korak u nastanku kardiovaskularnih komplikacija (77). Nedavni dokazi ističu složenu ulogu ROS-a u regulaciji vaskularnog tonusa kod bolesti.  $H_2O_2$  može djelovati kao vazodilator i/ili vazokonstriktor ovisno o krvnoj žili, vrsti koja se ispituje te uvjetima pokusa.  $H_2O_2$  ubrzava otpuštanje NO-a i aktiviranje solubilne gvanilat ciklaze te posljedično opuštanje glatkog mišićja. Ovaj proces je u potpunosti ovisan o endotelu i posredovan je NO-om. Vazokonstriktorni mehanizam  $H_2O_2$  može uključiti aktivaciju fosfolipaze  $A_2$  i fosfolipaze C, COX-a, tirozin kinaze, te puteve sinteze tromboksana  $A_2$ . Kardiovaskularne bolesti smanjuju biodostupnost NO-a povećavajući stvaranje slobodnih kisikovih radikala. Naprimjer, kod životinja su kardiovaskularne bolesti udružene s oštećenim protokom potaknutim otpuštanjem NO-a zbog stvaranja ROS-a (199). Suprotno, u stanjima koronarne arterijske bolesti alternativni dilatorni mehanizmi, uključujući vaskularnu proizvodnju  $H_2O_2$ , zamjenjuju mehanizme vaskularne relaksacije posredovane NO-om u cirkulaciji masnog tkiva (79).

Dok su stanja bolesti, kao što je pretilost, udružena s kardiovaskularnim rizikom koji smanjuje o NO-u ovisnu vazodilataciju povećavajući proizvodnju ROS-a, drugi dokazi pokazuju da se kod bolesti neki drugi endotelni posrednici dilatacije otpuštaju i nadoknađuju



manjak NO-a za vrijeme protokom i agonistom potaknte aktivacije endotela (79,81). Drugi pak dokazi naglašavaju da ROS, poput  $H_2O_2$ , mogu djelovati vazodilatacijski u fiziološkim, ali i patološkim, uvjetima (200,201). Viridis i suradnici su izvijestili kako sakupljač superoksidnih radikala, tempol, povećava acetilkolinom potaknutu dilataciju u visceralnom masnom tkivu kod pretilih bolesnika (202). Matoba i suradnici su pokazali da je  $H_2O_2$  glavni čimbenik dilatacije koji se otpušta iz endotela svinjskih koronarnih krvnih žila (203). Koronarne krvne žile također proizvode  $H_2O_2$  koji doprinosi dilataciji koronarnih arterija (81). Sukladno ovim studijama, rezultati naše studije pokazuju da PEG-katalaza smanjuje protokom potaknutu dilataciju i proizvodnju  $H_2O_2$  (Slike 12, 16) za vrijeme protoka u otporničkim žilama potkožnog masnog tkiva, predlažući da  $H_2O_2$  može doprinijeti dilatacijskoj funkciji kod pretilih osoba.

Ranije studije ukazuju na to da je vaskularna disfunkcija za vrijeme pretilosti povezana s povećanim stvaranjem vaskularnog ROS-a i s upalom (178, 193), koji imaju ključnu ulogu u patogenezi ateroskleroze. Studije ukazuju da je nakupljanje visceralnog masnog tkiva izrazito povezano s kardiovaskularnim rizičnim čimbenicima i endotelnom disfunkcijom više nego nakupljanje potkožnog masnog tkiva. S obzirom na to da je visceralni tip pretilosti značajan rizični čimbenik za razvoj kardiovaskularnih bolesti, endotelna disfunkcija u masnom tkivu mogla bi biti rani znak bolesti (193).

Matoba i suradnici su prvi predložili vodikov peroksid kao EDHF, kada su pokazali da katalaza, sakupljač  $H_2O_2$ , inhibira vazodilataciju i hiperpolarizaciju u odgovoru na acetilkolin u mišjim mezenterijskim arterijama (201). Patološka proizvodnja ROS-a, uključujući  $H_2O_2$ , je opisana u oboljelim žilama (79). U odsustvu patoloških uvjeta acetilkolin potiče vazodilataciju otpuštajući NO iz endotela (204,205). Dilatacija krvnih žila, kao odgovor na acetilkolin iz visceralnog masnog tkiva, smanjena je u odnosu na potkožno masno tkivo, pokazujući da je fiziološki (protok) i farmakološki poticaj NOS-a izmijenjen u visceralnom masnom tkivu. Zanimljivo, mehanizmi dilatacije na acetilkolin krvnih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva slični su onima na protok, a o istome je izvijesila i Farb (189). U našem istraživanju, nismo pronašli dodatni učinak indometacina ili katalaze na acetilkolinom potaknutu dilataciju visceralnog masnog tkiva (Slike 8 i 10), što je suprotno ranijim izvještajima u kojima indometacin poboljšava dilataciju u visceralnom masnom tkivu (190). Iako rezultati ranijih studija pokazuju jače smanjenje acetilkolinom potaknute dilatacije visceralnog masnog tkiva nego naši rezultati, moguće je da spomenuta razlika može nastati

zbog razlika u težini pridruženih komorbiditeta, jer naše ispitanice nisu imale dijabetes niti dislipidemiju. Potrebne su daljnje studije koje bi odredile ima li stupanj bolesti utjecaj na spomenute razlike kao i utjecaj pretilosti pridruženih komorbiditeta na osjetljivost arteriola na o endotelu ovisne podražaje u masnom tkivu.

Dobro je poznato kako endotel ima važnu ulogu u regulaciji vaskularnog tonusa proizvodeći i otpuštajući nekoliko posrednika vazodilatacije, uključujući NO, PGI<sub>2</sub> i EDHF. Široko je prihvaćeno da EDHF imaju važnu ulogu u oblikovanju vazomotornog tonusa, posebice u mikrocirkulaciji (11-13). Studije (53-55) su opisale vazodilataciju koja je neovisna o NO i PGI<sub>2</sub>, a može se oslabiti inhibitorima citokroma P450. Inhibitori NOS-a povećavaju doprinos metabolita citokroma P450 vazodilataciji (206), predlažući ulogu EDHF-a kao kompenzatorni mehanizam kada je proizvodnja NO-a oštećena u pretilosti. S obzirom na to da indometacin, 17-ODYA, i katalaza smanjuju protkom potaknutu dilataciju u potkožnom masnom tkivu (Slike 3, 11 i 12), također je moguće da su metaboliti citokroma P450 i COX enzimi izori ROS-a, kao što je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ovome tkivu (207). Uzeti zajedno, naši rezultati ukazuju da endotelni dilatatori posrednici osim NO-a (npr. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i metaboliti citokroma P450) mogu doprinijeti protkom potaknutoj dilataciji potkožnog masnog tkiva u pretilosti. Suprotno potkožnom masnom tkivu, 17-ODYA, ali ne i katalaza, smanjuje preostalu protkom potaknutu dilataciju u visceralnom masnom tkivu (Slike 13 i 14). Ovi rezultati ukazuju na to da je put metabolizma citokroma P450 djelomično odgovoran za vazodilataciju u otporničkim žilama visceralnog masnog tkiva, kada drugi putevi vazodilatacije ne doprinose protkom potaknutoj dilataciji. Prethodne studije o koronarnoj cirkulaciji su izvijestile kako su vazodilatatori metaboliti citokroma P450 prisutni u koronarnoj bolesti, kada je smanjena vazodilatacija posredovana dušikovim oksidom (81). Dakle, moguće je da su metaboliti citokroma P450 odgovorni za vazodilataciju u masnom tkivu čuvani za vrijeme bolesti u prisutnosti (SAT) i odsutnosti (VAT) vazodilatacije posredovane dušikovim oksidom.

Naše spoznaje da je NO smanjen u visceralnom masnom tkivu uspoređujući ga s potkožnim potvrđene su određivanjem proizvodnje NO-a u vaskularnom zidu. Iako točan mehanizam ove specifične razlike u proizvodnji NO-a između potkožnog i visceralnog masnog tkiva nije poznat, proizvodnja ROS-a, odnosno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, je bila povećana u visceralnom masnom tkivu u usporedbi s potkožnim masnim tkivom (Slika 16). Moguće je da su upalni citokini odgovorni za stvaranje ROS-a povećani u visceralnom masnom tkivu u usporedbi s potkožnim masnim tkivom (191).

### 6.3. Ograničenja studije

Ova studija ima nekoliko ograničenja. Prvo, studija je ograničena na skupinu mladih, morbidno pretilih (ITM  $>40 \text{ kg/m}^2$ ) žena što ograničava generaliziranje dobivenih rezultata. Potrebne su daljnje studije koje bi istražile moguće razlike u vaskularnoj reaktivnosti između muškaraca i žena. Drugo, uzorak tkiva dobiven je biopsijom potkožnog i visceralnog masnog tkiva za vrijeme planirane barijatrijske operacije pretilosti i nije bilo moguće prikupiti fiziološke podatke nakon gubitka tjelesne mase. U studiju je bilo teško uključiti žene prema fazi njihovog menstrualnog ciklusa, koja bi mogla imati utjecaj na endotelnu funkciju u ovoj populaciji ispitanica. Međutim, iz studije smo isključili bolesnike s nusnalazima koji bi mogli mijenjati mehanizme ili veličinu vazodilatacije neovisno o pretilosti (npr. kardiovaskularne bolesti ili dijabetes). Očekujemo da ćemo u budućnosti utvrditi učinak umjerenog stupnja pretilosti kao i učinak mršavljenja na vaskularnu funkciju u masnom tkivu.

Bazični promjer bio je različit između otporničkih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva, što bi moglo utjecati na veličinu dilatacije kao odgovor na vazodilatatorni poticaj. Međutim, kada se protkom potaknuta dilatacija uspoređi u podskupini uzoraka sličnih bazičnih promjera u oba masna tkiva, veličina dilatacije bila je slična odgovoru cijele grupe.

### 6.4. Klinički značaj studije

Pretilost je glavni čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti (114) i endotelna disfunkcija u visceralnom masnom tkivu mogla bi biti početni korak u nastanku kardiovaskularnih komplikacija. Brojne studije pokazuju da je vaskularna disfunkcija za vrijeme pretilosti povezana s povećanim stvaranjem ROS-a i upalom, koji imaju ključnu ulogu u patogenezi ateroskleroze (178,208). Kod ljudi s velikom količinom visceralnog masnog tkiva dolazi dio postprandijalnog nakupljanja masti i peroksidacije (193), učinak koji bi mogao biti povezan s razlikama otpuštanja upalnih citokina iz različitih depoa masnog tkiva (209). NO smanjuje lipolizu u adipocitima (210) i to bi moglo predstavljati važnu autoregulacijskupoveznicu između postprandijalnog protoka krvi, kada krvni protok (potaknut proizvodnjom NO-a) može povećati iskoristivost hranidbenih supstrata, odlaganje glukoze i ekstrakciju triglicerida. S druge strane, perivaskularno bi masno tkivo moglo biti vrlo važan modulator vazodilatacijskog mehanizma ovisnog o endotelu, npr. ranije su studije pronašle kako perivaskularno masno tkivo može poboljšati vazodilataciju i biodostupnost NO-a (211). Buduće bi studije trebale utvrditi bi li antikontrakcijski učinak perivaskularnog

masnog tkiva mogao biti odgovoran za razliku u protokm potaknutoj dilataciji između potkožnog i visceralnog masnog tkiva i povezanost visceralnog masnog tkiva kod morbidno pretilih osoba s povećanim kardiovaskularnim rizikom. Tako protokom izmijenjena proizvodnja NO-a, ili drugih vazodilatatornih metabolita u visceralnom masnom tkivu, može predstavljati poveznicu između pretilosti, nakupljanja masnog tkiva, metabolizma i rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti, te također može biti prognostički čimbenik za buduće kardiovaskularne događaje.

## 7. ZAKLJUČCI

- U ljudskoj je pretilosti vazodilatorna osjetljivost na protok otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva smanjena u usporedbi s otporničkim arteriolama potkožnog masnog tkiva
- U ljudskoj je pretilosti vaskularni odgovor otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva na acetilkolin smanjen u odnosu na otporničke arteriole potkožnog masnog tkiva
- Kod morbidno pretilih žena endotelna disfunkcija dovodi do neuravnoteženosti između vazodilatatornih i vazokonstriktorskih endotelnih posrednika, u korist vazokonstrikcije
- Dušikov oksid je u velikoj mjeri odgovoran za o endotelu ovisnu, protokom i acetilkolinom potaknutu, vazodilataciju otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva (ali ne i otporničkih arteriola visceralnog masnog tkiva), budući da inkubacija s inhibitorom NO sintetaze, L-NAME-om, smanjuje dilataciju tih žila
- Ciklooksigenazni metaboliti arahidonske kiseline kod pretilih su žena uključeni u mehanizam protokom i acetilkolinom potaknute dilatacije otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva, dok kod visceralnog masnog tkiva nemaju učinak na dilataciju žila
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sudjeluje u mehanizmima protkom i acetilkolinom potaknute dilatacije otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva, dok metaboliti citkroma P450 djelomično doprinose mehanizmima protokom potaknute dilatacije otporničkih arteriola i potkožnog i visceralnog masnog tkiva
- U ljudskoj pretilosti bi mehanizam vazodilatacije otporničkih arteriola potkožnog masnog tkiva, kao odgovor na protok i acetilkolin, mogao uključivati NO, PGs i/ili EDHF te ROS, dok je najvažniji posrednik u žilama visceralnog masnog tkiva metabolit citkroma P450

## 8. SAŽETAK

**Ključne riječi:** izolirane rezistentne krvne žile, endotel, protokom posredovana vazodilatacija, acetilkolin, metabolizam arahidonske kiseline, potkožno masno tkivo, visceralno masno tkivo

**Cilj:** Glavni su ciljevi ovog istraživanja bili 1) testirati hipotezu da je mikrovaskularna osjetljivost na protokom (FID), kao i acetilkolinom (AChID), posredovanu dilataciju smanjena u krvnim žilama visceralnog (VAT) masnog tkiva u usporedbi s potkožnim (SAT); 2) istražiti mehanizme koji doprinose smanjenoj protokom posredovanoj vazodilataciji ljudskih krvnih žila potkožnog i visceralnog masnog tkiva u pretilosti.

**Metode:** Krvne žile izolirane su iz bioptata potkožnog i visceralnog masnog tkiva pretelih žena (N=53) te su kanulirane na staklene mikropipete u sustavu za mjerenje vaskularne reaktivnosti. Mjerene su promjene promjera krvne žile u odgovoru na povećanje protoka (gradijent tlaka 10-100 cmH<sub>2</sub>O), te odgovoru na acetilkolin (ACh, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup> M). Mjeren je bazični odgovor žila, te u prisutnosti inhibitora dušik-oxid sintetaze, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME, 10<sup>-4</sup> M); indometacina, inhibitora ciklooksigenaze (INDO; 10<sup>-5</sup>M); katalaze, koja uklanja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (PEG-CAT; 500 U/ml); i u prisutnosti neselektivnog inhibitora citokroma P450, 17-octadecynoic acid (17-ODYA; 10<sup>-5</sup> M). Također, fluorescentnim je mikroskopom mjereno stvaranje dušikovog oksida (NO) i vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) u krvnim žilama, prije i nakon povećanja protoka kroz žilu.

**Rezultati:** Otporničke krvne žile VAT su manje osjetljive na povećanje protoka ili koncentracije acetilkolina u odnosu na one iz SAT. L-NAME, kao i INDO, značajno smanjuju FID potkožnih krvnih žila, dok dodani zajedno nemaju jači učinak na dilataciju. L-NAME ili INDO pojedinačno nemaju učinak na FID visceralnih krvnih žila, ali zajednički učinak im je značajan pri višim protocima. 17-ODYA djelomično smanjuje FID u krvnim žilama potkožnog, ali i visceralnog masnog tkiva uspoređujući ju s bazičnim odgovorom. PEG-CAT smanjuje FID žila potkožnog masnog tkiva, ali ne utječe na žile visceralnog.

L-NAME, INDO i PEG-CAT značajno smanjuju AChID potkožnih krvnih žila, ali nemaju učinak u visceralnim žilama.

U stanju bez protoka, proizvodnja NO-a je povećana u SAT uspoređujući ju s VAT. L-NAME u SAT smanjuje proizvodnju NO-a. U prisutnosti intraluminalnog protoka, proizvodnja NO-a je povećana i u SAT i VAT, a L-NAME smanjuje NO proizvodnju u SAT. Također, za vrijeme protoka, PEG-CAT značajno smanjuje DCF florescenciju u SAT, ali ne i u VAT.

**Zaključak:** U pretilosti su krvne žile visceralnog masnog tkiva manje osjetljive na povećanje protoka i protkom posredovane proizvodnje NO-a, uspoređujući ih s krvnim žilama potkožnog masnog tkiva. Protokom potaknuta vaskularna reaktivnost otporničkih arteriola potkožnog i visceralnog masnog tkiva posredovana je različitim regulacijskim mehanizmima.

## 9. SUMMARY

### MICROVASCULAR REACTIVITY OF SUBCUTANEOUS AND VISCERAL ADIPOSE TISSUE IN HUMAN OBESITY

**Key words:** human isolated resistance arteries, endothelium, flow-induced dilation, acetylcholine, vasodilation, metabolism of arachidonic acid, subcutaneous adipose tissue, visceral adipose tissue

**Objective:** The primary goals of the present study were to 1) test the hypothesis that microvascular flow-induced dilation (FID) and acetylcholine-induced dilation (AChID) are impaired in visceral (VAT) compared to subcutaneous adipose tissue (SAT) in obese patients and 2) determine the mechanisms contributing to reduced vasodilator sensitivity to flow in human visceral and subcutaneous adipose tissue arterioles in human obesity.

**Methods:** Vessels from 53 morbidly obese women (BMI>40 kg/m<sup>2</sup>) were collected from SAT and VAT biopsies and were cannulated for vascular reactivity measurements in response to flow (pressure gradients of 10-100 cmH<sub>2</sub>O) and in response to acetylcholine (ACh, 10<sup>-9</sup>-10<sup>-4</sup> M). Flow- and acetylcholine- mediated vasodilation was observed in the presence and absence of nitric oxide synthase (NOS) inhibitor *N*<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10<sup>-4</sup> M), cyclooxygenase inhibitor indomethacin (INDO; 10<sup>-5</sup>M), the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger poly ethyleneglycol catalase (PEG-CAT; 500 U/ml), and non selective cytochrome P450 pathway inhibitor 17-octadecynoic acid (17-ODYA; 10<sup>-5</sup> M).Also, nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) generation in arterioles was detected with fluorescence microscopy, in the presence and absence of flow.

**Results:** Dilator responses of VAT resistance arteries were less sensitive to increase flow, but also to ACh compared to SAT vessels. L-NAME significantly reduced FID in SAT microvessels. INDO reduced FID in SAT microvessels too, but had no additional effect in the presence of L-NAME. There was no effect of L-NAME or INDO alone on FID of VAT microvessels, but addition of L-NAME to INDO reduced FID at higher flow rates. The presence of 17-ODYA partially reduced FID of microvessels from both SAT and VAT, compared to baseline. PEG-CAT reduced FID of SAT microvessels, but had no effect on resistance arteries from VAT.



There was a significant reduction in AChID in arterioles from SAT in the presence of L-NAME, INDO and PEG-CAT , but had no effect in microvessels from VAT.

In the absence of intraluminal flow, NO production was increased in vessels from SAT compared to VAT, and presence of L-NAME reduced NO production in vessels from SAT, but not in vessels from VAT. In the presence of intraluminal flow, NO production was increased in both SAT and VAT microvessels, and was reduced in SAT by NOS inhibition with L-NAME. During flow PEG-CAT significantly reduced DCF fluorescence in SAT but not in VAT.

**Conclusion:** During obesity, arterioles of visceral fat are less sensitive to flow-induced dilation and flow-induced NO generation compared to arterioles of subcutaneous adipose tissue. Microvascular reactivity to flow is mediated by different regulatory mechanisms in visceral and subcutaneous fat.

## 10. LITERATURA

- 1) Christensen KL, Mulvany MJ. Location of resistance arteries. *J Vasc Res.*2001;38:1-12.
- 2) Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.*2004;93:105-13.
- 3) Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Radic Res.*2007;41:1364-75.
- 4) van Hinsbergh WM. Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler Thromb Vascular Biol.*1997;17:1018–23.
- 5) Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.*2011;164:894–912.
- 6) Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *J Med Chem.*2007;50:1425-41.
- 7) FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A<sub>2</sub> as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol.*1991;68:11B-15B.
- 8) Félétou M, Cohen RA, Vanhoutte PM, Verbeuren TJ. TP Receptors and oxidative stress: hand in hand from endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Adv Pharmacol.*2010;60:85–106.
- 9) Roman RJ, Maier KG, Sun CW, Harder DR, Alonso-Galicia M. Renal and cardiovascular actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*2000;27(11):855-65.
- 10) Rosolowsky M, Campbell WB. Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) and epoxyeicosatrienoic acids (EETs) by cultured bovine coronary artery endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.*1996;1299:267-77.
- 11) Campbell WB, Falck JR. Arachidonic Acid Metabolites as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Hypertension.*2007;49:590-6.
- 12) Feletou M, Vanhoutte PM: EDHF: an update. *Clin Sci (Lond).*2009;117:139–55.

- 13) Feletou M, Kohler R, Vanhoutte PM. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep.*2010;12:267-75.
- 14) Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovasc Med J.*2010;4:302-312.
- 15) Gonçalves Dias R, Negrão CE, Krieger MH. Nitric Oxide and the Cardiovascular System: Cell Activation, Vascular Reactivity and Genetic Variant. *Arq Bras Cardiol.*2011;96(1):68-75.
- 16) Vila E, Salaices M. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2005;288(3):H1016-21.
- 17) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.*1980;288:373-6.
- 18) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.*1987;84(24):9265-9.
- 19) Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.*1989; 2:997-1000.
- 20) Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.*2006;147:S193-S201.
- 21) Ignarro LJ. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol.*2002;53:503-14.
- 22) Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.*1986;250: H1145–9.
- 23) Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research. From the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly.*2010;140:w13122.
- 24) Tran QK, Ohashi K, Watanabe H. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res.*2000;48:13-22.
- 25) Fisher AB, Chien S, Barakat AI, Nerem RM. Endothelial cellular response to altered shear stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*2001;281:L529-33.

- 26) Walshe TE, Ferguson G, Connell P, O'Brien C, Cahill PA. Pulsatile flow increases the expression of eNOS, ET-1, and prostacyclin in a novel in vitro coculture model of the retinal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*2005;46:375–82.
- 27) Kuchan MJ, Frangos JA. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*1994;266:C628-36.
- 28) Pittner J, Wolgast M, Casellas D, Persson AE. Increased shear stress-released NO and decreased endothelial calcium in rat isolated perfused juxtamedullary nephrons. *Kidney Int.*2005;67:227-36.
- 29) Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.*1988;333:664–6.
- 30) Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest.*1997;100:2146-52.
- 31) Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.*1994;78:915–918.
- 32) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.*2001;357:593-615.
- 33) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, i sur. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA.*1998;95:9220-5.
- 34) Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.*1996;271:C1424-37.
- 35) Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, i sur. In vivo delivery of the caveolin- 1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med.*2000;6:1362-7.
- 36) Schilling WP, Elliott SJ. Ca<sup>2+</sup> signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol.*1992;262:H1617-30.
- 37) Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery

- and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther.*1986;237(3):893-900.
- 38) Collins P, Griffith TM, Henderson AH, Lewis MJ. Endothelium derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: a cyclic guanosine monophosphate-mediated effect. *J Physiol.*1986;381:427-37.
  - 39) Okahara K, Sun B, Kambayashi J. Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*1998;18:1922–6.
  - 40) Koller A, Kaley G. Prostaglandins mediate arteriolar dilation to increased blood flow velocity in skeletal muscle microcirculation. *Circ Res.*1990;67:529–34.
  - 41) Mitchell JA, Ali F, Bailey L, Moreno L, Harrington LS. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium. *Exp Physiol.*2007;93.1pp141–147.
  - 42) Nakayama T. Prostacyclin analogues: prevention of cardiovascular diseases. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.*2006;4:351–9.
  - 43) Shimokawa H, Flavahan NA, Lorenz RR, Vanhoutte PM. Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig. *Br J Pharmacol.*1988;95:1197–1203.
  - 44) Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, i sur. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.*1995;91:1314–9.
  - 45) Mitchell JA, de Nucci G, Warner TD, Vane JR. Different patterns of release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin. *Br J Pharmacol.*1992;105:485–9.
  - 46) Busse R, Edwards G, Feletou M, i sur. EDHF: Bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci.*2002;23:374–80.
  - 47) Campbell, WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res.*1996;78:415–23.

- 48) Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, i sur. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature*.1999;401:493–97.
- 49) Bussemaker E, Popp Rudiger, Binder J, Busse R, Fleming I. Characterization of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) response in the human interlobar artery. *Kidney Int*.2003;63:1749–55.
- 50) Shimokawa H, Yasuaake H, Fujii K, i sur. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*.1996;28:703–11.
- 51) Griffith TM, Chaytor AT, Taylor HJ, i sur. cAMP facilitates EDHF-type relaxations in conduit arteries by enhancing electrotonic conduction via gap junctions. *Proc Natl Acad Sci USA*.2002;99:6392–7.
- 52) Chaytor AT, Martin PEM, Edwards DH, Griffith TM. Gap junctional communication underpins EDHF-type relaxations evoked by acetylcholine in the rat hepatic artery. *Am J Physiol*.2001;280:H2441-50.
- 53) Halcox JP, Narayanan S, Cramer-Joyce L, i sur. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the human forearm microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*2001;208:H2470–7.
- 54) Miura H, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to arachidonic acid depends on cytochrome P-450 monooxygenase and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Circ Res*.1998;83:501–7.
- 55) Coats P, Johnston F, MacDonald J, i sur. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Identification and mechanisms of action in human subcutaneous resistance arteries. *Circulation*.2001;103:1702–8.
- 56) Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Buralli S, Salvetti A. Vasodilation to bradykinin is mediated by an ouabain-sensitive pathway as a compensatory mechanism for impaired nitric oxide availability in essential hypertensive patients. *Circulation*.1999; 100:1400–5.
- 57) Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor. Where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2006;26:1215-25.
- 58) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature*.1998;396:269–72.

- 59) Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*.1994;368:850–3.
- 60) Ellis A, Triggle CR. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*.2003;81:1013–28.
- 61) Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol*.2011;164:839–52.
- 62) Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol*.1985;248:C550-6.
- 63) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, i sur. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by cultured endothelial cells. *Nature*.1988;332:411-5.
- 64) Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, i sur. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*.1989;86:2863-7.
- 65) Luscher TF, Yang Z, Tschudi M, Von SL, Stulz P, Boulanger C, i sur. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res*.1990;66:1088-94.
- 66) Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, takaku F, Yanagisawa m, Masaki T, i sur. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*.1989;161:859-64.
- 67) Kourembanas S, Marsden PA, McQuillan LP, Faller DV. Hypoxia induces endothelin gene expression and secretion in cultured human endothelium. *J Clin Invest*.1991;88:1054-7.
- 68) Kohno M, Murakawa K, Yokokawa K, Yasunari K, horio T, Kurihara N, i sur. Production of endothelin by cultured porcine endothelial cells: modulation by adrenaline. *J Hypertens Suppl*.1989;7:S130-1.

- 69) Ohta K, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Emori T, Shichiri M, i sur. Cytokine-induced release of endothelin-1 from porcine renal epithelial cell line. *Biochem Biophys Res Commun.*1990;169:578-84.
- 70) Kiely DG, Cargill RI, Struthers AD, Lipworth BJ. Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in man. *Cardiovasc Res.*1997;33:378-86.
- 71) Koller A, Sun D, Huang A, Kaley G. Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*1994;267:H326-32.
- 72) Koller A. Signaling pathways of mechanotransduction in arteriolar endothelium and smooth muscle cells in hypertension. *Microcirculation.*2002;9:277-294.
- 73) Koller A, Huang A. Impaired nitric oxide-mediated flow-induced dilation in arterioles of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.*1994;74:416-421.
- 74) Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol.*1990;259:H1063-1070.
- 75) Koller A, Kaley G. Shear stress dependent regulation of vascular resistance in health and disease: role of endothelium. *Endothelium.*1996;4:25.
- 76) Paniagua OA, Bryant MB, Panza JA. Role of endothelial nitric oxide in shear stress-induced vasodilation of human microvasculature: diminished activity in hypertensive and hypercholesterolemic patients. *Circulation.*2001;103:1752-8.
- 77) Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interactions. *J Am Coll Cardiol.*1994;24:1468-74.
- 78) Kuo L, Davis MJ, Cannon MS, Chilian WM. Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation. Restoration of endothelium dependent responses by L-arginine. *Circ Res.*1992;70:465-76.
- 79) Phillips SA, Hatoum OA, Gutterman DD. The mechanism of flow-induced dilation in human adipose arterioles involves hydrogen peroxide during CAD. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2007;292:H93–100.
- 80) Grizelj I, Cavka A, Bian JT, Szczurek M, Robinson A, Shinde S, i sur. Reduced flow- and acetylcholine-induced dilations in visceral compared to subcutaneous adipose



- arterioles in human morbid obesity. *Microcirculation*.2014Aug23.doi:10.1111/micc.12164.
- 81) Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res*.2001;92:e31–40.
  - 82) Wang W and Diamond SL. Does elevated nitric oxide production enhance the release of prostacyclin from shear stressed aortic endothelial cells? *Biochem Biophys Res Commun*.1997;233:748–51.
  - 83) Herschman HR. Function and regulation of prostaglandin synthase 2. *Adv Exp Med Biol*.1999;469:3–8.
  - 84) Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, et al. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation*.2003;107:1040–5.
  - 85) Liu Y, Zhao H, Li H, Kalyanaraman B, Nicolosi AC, Gutterman DD. Mitochondrial sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries. *Circ Res*.2003;93:573–80.
  - 86) Thengchaisri N, Kuo L. Hydrogen peroxide induces endothelium-dependent and -independent coronary arteriolar dilation: role of cyclooxygenase and potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.2001;285:H2255–63.
  - 87) Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res*.2005;68:26–36.
  - 88) Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig. *J Physiol (Lond)*.1984;351:549–572.
  - 89) Hecker M, Bara AT, Bauersachs J, Busse R. Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in mammals. *J Physiol (Lond)*.1994;481:407–14.
  - 90) Nagao T, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor and endothelium-dependent relaxations. *Am J Respir Cell Mol Biol*.1993;8:1–6.

- 91) Kellogg DL, Zhao JL, Coey U, Green JV. Acetylcholine-induced vasodilation is mediated by nitric oxide and prostaglandins in human skin. *J Appl Physiol.*2005;98:629-32.
- 92) Dong H, Wajdron GJ, Galipeau D, Cole WC, Triggle CR. NO/PGI<sub>2</sub>-independent vasorelaxation and the cytochrome P450 pathway in rabbit carotid artery. *Br J Pharmacol.*1997;120:695-701.
- 93) Lüscher TF, Vanhoutte PM. The endothelium: Modulator of cardiovascular function. CRC Press, Boca Raton 1990.
- 94) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.*2000;87:840–4.
- 95) Schulz E, Jansen T, Wenzel P, i sur. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.*2008,10:1115–26.
- 96) Panza JA, Quyyumi AA, Brush JJ, Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.*1990;323:22–7.
- 97) Taddei S, Viridis A, Mattei P, Arzilli F, Salvetti A. Endothelium-dependent forearm vasodilation is reduced in normotensive subjects with familial history of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.*1992;20:S193–5.
- 98) Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, i sur. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation.*1993;88:2149–55.
- 99) Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, i sur. Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med.*1996;334:150–4.
- 100) Makimattila S, Virkamaki A, Groop PH, Cockcroft J, Utriainen T, Fagerudd J, i sur. Chronic hyperglycemia impairs endothelial function and insulin sensitivity via different mechanisms in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation.*1996;94:1276–82.

- 101) Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest.*1996;97:2601–10.
- 102) Hurlimann D, Forster A, Noll G, Enseleit F, Chenevard R, Distler O, i sur. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation.*2002;106:2184–7.
- 103) Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol.*1989;257:H33–7.
- 104) Huie RE, Padmaja S. The reaction of no with superoxide. *Free Radic Res Commun.*1993;18:195–9.
- 105) Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47-95.
- 106) Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.*2005;7:308-317.
- 107) Si J, Fu X, Behar J, Wands J, Beer DG, Souza RF, i sur. NADPH oxidase NOX5-S mediates acid-induced cyclooxygenase-2 expression via activation of NK-kB in Barrett`s esophagelak adenocarcinoma cells. *J biol Chem.*2007;282:16244-55.
- 108) Montezano AC, Burger D, Ceravolo GS, Yusuf H, Montero M, Touyz RM. Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clin Sci (London).* 2011;120:131–41.
- 109) Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem.*1997;272:18515-7.
- 110) Cai H. NAD(P)H Oxidase-Dependent Self-Propagation of Hydrogen Peroxide and Vascular Disease. *Circ Res.*2005;96:818-22.
- 111) Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide ia an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol.*2005;39(5):725-32.
- 112) World Health Organization Report. Avaiable from: [www.who.int/topics/obesity/en/](http://www.who.int/topics/obesity/en/)
- 113) Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition.*2001;17:953–966.
- 114) Bray GA. Medical consequence of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.*2004;89:2583-9.

- 115) Hotamisligli GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*.2006;444:860-867.
- 116) Avogaro A, de Kreutzenberg SV. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clin Chim Acta*.2005;360:9-26.
- 117) Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*.2004;89:2548–2556.
- 118) Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obes Res*.2003;11:1278–1289.
- 119) Hamdy O, Ledbury S, Mullooly C, i sur.Lifestyle modification improves endothelial function in obese subjects with the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care*.2003;26:2119–2125.
- 120) Mattu HS, Randeve HS. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol*.2013;2:216:T17-36.
- 121) Zhang J, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*.1994;372:425-432.
- 122) Correia ML, Haynes WG. Leptin, obesity and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*.2004;13:215–223.
- 123) Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J*.1999;13:1231–1238.
- 124) Chu NF, Chang JB, Shieh SM. Plasma leptin, fatty acids, and tumor necrosis factor-receptor and insulin resistance in children. *Obes Res*.2003;11:532–540.
- 125) Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res*.2003;11:525–531.
- 126) Lembo G, Vecchione C, Fratta L, et al. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*.2000;49:293–297.
- 127) Vecchione C, Maffei A, Colella S, i sur.Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*.2002;51:168–173.

- 128) Matsuda K, Teragawa H, Fukuda Y, Nakagawa K, Higashi Y, Chayama K. Leptin causes nitric-oxide independent coronary artery vasodilation in humans. *Hypertens Res.*2003;26:147–152.
- 129) Tsuda K, Nishio I. Role of leptin in regulating nitric oxide production and membrane microviscosity. *Circulation.*2004;109(22):e316.
- 130) Mastronardi CA, Yu WH, McCann SM. Resting and circadian release of nitric oxide is controlled by leptin in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2002;99(8),pp.5721–5726.
- 131) Stepan CM, Brown EJ, Wright CM, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2001;98:502–506.
- 132) Verma S, Li SH, Wang CH, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine–endothelial interaction. *Circulation.*2003;108:736–40.
- 133) Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrin Metab.*2002;13:84–9.
- 134) Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med.*2001;7:947–53.
- 135) Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophysical Res Commun (Berl).*1999;257:79–83.
- 136) Shargorodsky M, Boaz M, Goldberg Y, Matas Z, Gavish D, Fux A, Wolfson N. Adiponectin and vascular properties in obese patients: is it a novel biomarker of early atherosclerosis? *Int J Obes (Lond).*2009;33:553-55.
- 137) Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.*2005;115:911–9.
- 138) Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.*2003;278:45021–6.
- 139) Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension.*2003;42:231–234.

- 140) Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, CAD Study Group, i sur. Coronary artery disease. Association of Hypoadiponectinemia with Coronary Artery Disease in Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2003;23:85–89.
- 141) Thalmann S, Meier C. Local adipose tissue depots as cardiovascular risk factors. *Cardiovasc Res.*2007;75:690-701.
- 142) Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol.*1999;11:226–32.
- 143) Anderson HD, Rahmutula D, Gardner DG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem.*2004;279:963–9.
- 144) Aljada A, Ghanim H, Assian E, Dandona P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthase and reduces insulin receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cell. *Metabolism.*2002;51:487–91.
- 145) Maenhaut N, Van de Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med.*2011;16:9-25.
- 146) Dodd-o JM, Welsh LE, Salazar JD, i sur. Effect of NADPH oxidase inhibition on cardiopulmonary bypass-induced lung injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2004;287:H927–36.
- 147) Yan SF, Ogawa S, Stern DM, Pinsky DJ. Hypoxia-induced modulation of endothelial cell properties: regulation of barrier function and expression of interleukin-6. *Kidney Int.*1997;51:419–25.
- 148) Devaraj S, Venugopal SK, Singh U, Jialal I. Hyperglycemia induces monocytic release of interleukin-6 via induction of protein kinase C- $\alpha$  and  $\beta$ . *Diabetes.*2005;54:85–91.
- 149) Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, i sur. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res.*2004;94:534–41.
- 150) Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation.*2002;18:101:1767–72.

- 151) Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*1999;19:972–8.
- 152) Niskanen L, Laaksonen DE, Nyyssonen K, i sur. Inflammation, abdominal obesity, and smoking as predictors of hypertension. *Hypertension.*2004;44:859–65.
- 153) Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.*2002;102:2165–8.
- 154) Ikeda U, Takahashi M, Shimada K. C-reactive protein directly inhibits nitric oxide production by cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.*2003;42:607–11.
- 155) Karelis AD. Metabolically healthy but obese individuals. *Lancet.*2008;372:1281-3.
- 156) Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, St-Pierre DH, Brochu M, Prud'homme D, Rabasa-Lhoret R. The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol Metab.*2005;90:4145-50.
- 157) Karelis AD, Brochu M, Rabasa-Lhoret R. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes and Metab.*2004;30:569–72.
- 158) Stefan N, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Thamer C, Rittig K, i sur. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med.*2008;168:1609–16.
- 159) You T, Nicklas BJ, Ding J, i sur. The metabolic syndrome is associated with circulating adipokines in older adults across a wide range of adiposity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*2008;63:414–9.
- 160) Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol.*2012;205:194-208.
- 161) Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipose secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes.*2007;56:1010-3.
- 162) Hajer GR, van Haefen TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular disease. *Eur Heart J.*2008;29:2959-71.

- 163) Romero-Corral A, Sert- Kuniyoshi FH, Sierra-Johnson J, Orban M, Gami A, Davison D, i sur. Modest visceral fat gain causes endothelial dysfunction in healthy humans. *J Am Coll Cardiol*.2010;56:662-6.
- 164) Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*.2006;444:875-80.
- 165) Vigili de Kreutzenberg S, Kiwanuka E, Tiengo A, Avogaro A. Visceral obesity is characterized by impaired nitric oxide-independent vasodilation. *Eur Heart J*.2003;24:1210-5.
- 166) Orr JS, Gentile CL, Davy BM, Davy KP. Large artery stiffening with weight gain in humans. Role of visceral fat accumulation. *Hypertension*.2008;51:1519-24.
- 167) Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res*.2009;335:165-89.
- 168) Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, i sur. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation*.2007;116:1234-41.
- 169) Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Adams RJ, Berry JD, Brown TM, i sur. Heart disease and stroke statistics-2011 update : a report from the American Heart Association. *Circulation*.2011;123:e18–e209.
- 170) O’Rahilly S, Farooq IS. Human Obesity: A Heritable Neurobehavioral Disorder That Is Highly Sensitive to Environmental Conditions. *Diabetes*.2008;57:2905-10.
- 171) Selthofer-Relatić K, Radic R, Vizjak V, Včev A, Kosovic P, Bosnjak I, Selthofer R. Hyperleptinemia-non-haemodynamic risk factor for the left ventricular hypertrophy development in hypertensive overweight females.*Coll Antropol*.2008;32:681-5.
- 172) Selthofer-Relatić K, Radic R, Včev A, Steiner R, Vizjak V, Sram M, i sur. Low adiponectin serum level-reduced protective effect on the left ventricular wall thickness. *Coll Antropol*.2011;35:787-91.
- 173) de Jongh RT, Serné EH, IJzerman RG, de Vries G, Stehouwer CD. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. *Circulation*.2004;109:2529-35.



- 174) Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*.2002;347:305-13.
- 175) McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation*.2002;105:2712-8.
- 176) Jonk AM, Houben AJ, de Jongh RT, Serné EH, Schaper NC, Stehouwer CD. Microvascular Dysfunction in Obesity: A Potential Mechanism in the Pathogenesis of Obesity-Associated Insulin Resistance and Hypertension. *Physiology (Bethesda)*.2007;22:252-60.
- 177) Meyers MR, Gokce N. Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*.2007;14:365-9.
- 178) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*.2004;114:1752– 61.
- 179) Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*.2002;23:599–622.
- 180) Barton M, Carmona R, Morawietz H, et al. Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin- converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. *Hypertension*.2000;35:329– 36.
- 181) Traupe T, Lang M, Goettsch W, et al. Obesity increases prostanoid-mediated vasoconstriction and vascular thromboxane receptor gene expression. *J Hypertens*.2002;20:2239– 45.
- 182) Traupe T, D’Uscio LV, Muentner K, Morawietz H, Vetter W, Barton M. Effects of obesity on endothelium-dependent reactivity during acute nitric oxide synthase inhibition: modulatory role of endothelin. *Clin Sci (Lond)*.2002;103:13S– 5S.
- 183) Mather KJ, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Interactions between endothelin and nitric oxide in the regulation of vascular tone in obesity and diabetes. *Diabetes*.2004;53:2060–6.
- 184) Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*.2002;51:3517– 23.

- 185) Hashimoto M, Akishita M, Eto M, i sur. The impairment of flow-mediated vasodilatation in obese men with visceral fat accumulation. *Int J Obes Relat Metab Disord.*1998;22:477– 84.
- 186) Szasz T, Bomfimi GF, Webb RC. The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis. *Vasc Health Risk Manag.*2013;9:105-16.
- 187) Gu P, Xu A. Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity and vascular dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord.*2013;14:49-58.
- 188) Vanhoutte M. Endothelial dysfunction in obesity. *Ann Pharm Fr.*2013;71:42-50.
- 189) Farb MG, Ganley-Leal L, Mott M, Liang Y, Ercan B, Widlansky ME, i sur. Arteriolar Function in Visceral Adipose Tissue Is Impaired in Human Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2012;32:467-73.
- 190) Farb MG, Tiwari S, Karki S, Ngo DTM, Carmine B, Hess DT, i sur. Cyclooxygenase inhibition improves endothelial vasomotor dysfunction of visceral adipose arterioles in human obesity. *Obesity.*2013;May3.doi:10.1002/oby.20505.
- 191) Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.*2006;444:881-7.
- 192) Nikolopoulou A, Kadoglou NP. Obesity and metabolic syndrome as related to cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.*2012;10:933-9.
- 193) Jang Y, Kim OY, Ryu HJ, Kim JY, Song SH, Ordovas JM, Lee JH. Visceral fat accumulation determines postprandial lipemic response, lipid peroxidation, DNA damage, and endothelial dysfunction in nonobese Korean men. *J Lipid Res.*2003;44:2356-64.
- 194) Seals DR, Gates PE. Stiffening our resolve against adult weight gain. *Hypertension.*2005;45:175-7.
- 195) Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension.*1994;23:229-35.
- 196) Salvemini D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell Mol Life Sci.*1997;53:576-82.

- 197) Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A, Kaley G. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice. *Circ Res.*1999;6:85:288-93.
- 198) Wu Y, Huang A, Sun D, Falck JR, Koller A, Kaley G. Gender-specific compensation for the lack of NO in the mediation of flow-induced arteriolar dilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2001;280:H2456-61.
- 199) Laurindo FR, Pedro MA, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O, da Luz PL. Vascular free radical release: ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res.*1994;74:700-9.
- 200) Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, i sur. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun.*2002;25:290:909-13.
- 201) Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, i sur. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.*2000;106:1521-30.
- 202) Viridis A, Santini F, Colucci R, Duranti E, Salvetti G, Rugani I, i sur. Vascular generation of tumor necrosis factor-alpha reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients. *J Am Coll Cardiol.*2011;58:238-247.
- 203) Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I, Urakami-Harasawa L, i sur. Electron spin resonance detection of hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary microvessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2003;1:23:1224-30.
- 204) Dharmashankar K, Welsh A, Wang J, Kizhakekuttu TJ, Ying R, Gutterman DD, Widlansky ME. Nitric oxide synthase-dependent vasodilation of human subcutaneous arterioles correlates with noninvasive measurements of endothelial function. *Am J Hypertension.*2012;25:528-34.
- 205) Erdei N, Toth A, Pasztor ET, Papp Z, Edes I, Koller A, Bagi Z. High-fat diet-induced reduction in nitric oxide-dependent arteriolar dilation in rats: role of xanthine oxidase-derived superoxide anion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2006;291:H2107-15.
- 206) Fichtlscherer S, Dimmeler S, Breuer S, Busse R, Zeiher AM, Fleming I. Inhibition of cytochrome P450 2C9 improves endothelium-dependent, nitric oxide-mediated

- vasodilatation in patients with coronary artery disease. *Circulation*.2004;20;109:178-83.
- 207) Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Synthase (Cytochrome P450 2C9) Is a Functionally Significant Source of Reactive Oxygen Species in Coronary Arteries. *Circ Res*.2001;19:88:44-51.
- 208) Kelly AS, Steinberger J, Kaiser DR, Olson TP, Bank AJ, Dengel DR. Oxidative stress and adverse adipokine profile characterize the metabolic syndrome in children. *J Cardiometab Syndr*.2006;1:248-52.
- 209) Phillips SA, Ciaraldi TP, Oh DK, Savu MK, Henry RR. Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E842-50.
- 210) Andersson K, Gaudiot N, Ribiere C, Elizalde M, Giudicelli Y, Arner P. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br J Pharmacol*.1999;126:1639-45.
- 211) Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation*.2009;119:1661-1670.

## 11. ŽIVOTOPIS

### **Ivana Grizelj, dr.med.**

Datum rođenja: 18. siječnja 1985.god.

Adresa: Ante Starčevića 5, 31 325 Čeminac, Hrvatska

e-mail adresa: grizelj.ivana@gmail.com

Matični broj znanstvenika: 324963

### **Obrazovanje:**

- listopad 2003. - svibanj 2009.: Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- studeni 2009. – do danas: Poslijediplomski studij *Biomedicina i zdravstvo*, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
- 2014. Program cjeloživotnog obrazovanja: pedagoško-psihološka i didaktičko-metodička izobrazba, modul B, Učiteljski fakultet Sveučilišta u Osijeku
- 2014. – do danas: Poslijediplomski specijalistički studij *Klinička epidemiologija*, Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

### **Radno iskustvo:**

- rujan 2009. - rujan 2010.: pripravnički staž doktora medicine u Kliničkom bolničkom centru Osijek
- veljača 2010. - do danas: asistentica na Katedri za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku
- veljača 2010. – 15.07.2013.: vanjska suradnica u naslovnom suradničkom zvanju asistenta na predmetu *Fiziologija s patofiziologijom* na Studiju fizioterapije Veleučilišta Lavoslava Ružičke u Vukovaru
- lipanj 2011. - srpanj 2012.: istraživačka suradnica u Vascular Biology Laboratory, Department of Physical Therapy, College of Applied Health Sciences University of Illinois, Chicago, IL, SAD

- studeni 2012. - do danas: specijalizantica Opće interne medicine na Klinici za unutarnje bolesti Kliničkoga bolničkog centra Osijek

### **Tečajevi trajnoga usavršavanja:**

- 22.-23. 3.2010. – sudjelovanje na Perimed<sup>®</sup> radionici o mikrocirkulaciji na School of Medicine University of Szeged, Szeged, Mađarska
- 29.3.-24.4.2010. – Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja liječnika I. kategorije – Klinički terapijski pokus. Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska
- 10.-11.9.2010. – Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja liječnika I. kategorije – Dijagnostika i liječenje upalnih bolesti crijeva. Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska
- 29.3.2011. - Meta Analysis Workshop (faciliators:Higgins, J. and Altman, D.) Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Split, Hrvatska
- 1.-2.4.2011. - Poslijediplomski tečaj trajnog usavršavanja liječnika I. kategorije – Suvremeni pristupi u dijagnostici i liječenju tumora dojke. Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska.
- 15.4.2011. - Training in Transgenetic Research Methodology in Biomedicine and Biotechnology (project CABCOS). Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska
- 20.6.2011. - HIPPA On-line Training in Human Subject Protection - Privacy Rule requirements for research projects, University of Illinois, Chicago, IL, SAD
- 10.12.2011.–Tečaj DL-101 Osnovni tečaj o intelektualnom vlasništvu, WIPO (World Intellectual Property Organisation) program, online tečaj
- 10.-14.12.2012. - Laboratory immunetechniques in molecular biology research, poslijediplomski tečaj, IPA projekt prekogranične suradnje Mađarska-Hrvatska „Health Impulse“, Pečuh, Mađarska
- 11.-15.1.2013. - Developmental biology of peripheral lymphoid tissues – crossroad between immunology and embryology, poslijediplomski tečaj, IPA projekt prekogranične suradnje Mađarska-Hrvatska „Health Impulse“, Pečuh, Mađarska

**Strani jezici:** engleski jezik - aktivno

**Stipendije i nagrade:**

- Stipendija za sudjelovanje na „ Joint Meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Hungarian Physiological Society Meeting (FEPS 2014), Budimpešta, Mađarska, 2014
- Stipendija za sudjelovanje na “Joint Meeting ESH-ISH Hypertension 2014”, Atena, Grčka, 2014
- Nagrada za postersku prezentaciju na „RECOOP HST Bridges 6th Annual Scientific Meeting“, 8.-10.4.2011, Bratislava, Slovačka
- Stipendija Sveučilišta J.J.Strossmayera za nadarene studente, 2005. – 2009.

**Aktivnost u znanstvenim projektima:**

- 30.5.-30.11.2011. Fond Jedinstvo uz pomoć znanja (Unity through Knowledge Fund, UKF), projektna agencija Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa Republike Hrvatske. „UKF Grant Agreement No. 88/11 Mechanisms of microcirculatory vascular reactivity in resistance arteries“. Sudjelovanje kaoglavni istraživač na projektu u kojem je Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku bio vodeća institucija na Vascular Biology Laboratory at the College of Applied Health Sciences, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL, SAD institucija domaćin

**Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:**

- 1) Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Bian, Jing-Tan, Szczurek, Mary; Robinson, Austin; Shinde, S; Nguyen, V; Braunschweig, C; Wang, E; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Reduced flow- and acetylcholine-induced dilations in visceral compared subcutaneous adipose arterioles in human morbid obesity. // Microcirculation.

10.1111/micc.12164 (2014); 101111/micc12164-101111/micc12164 (članak, znanstveni).

- 2) Cavka, Ana; Cosic, Anita; Grizelj, Ivana; Koller, Akos; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H; Phillips, Shane A; Drenjancevic, Ines. Effects of AT1 receptor blockade on plasma thromboxane A2 (TXA2) level and skin microcirculation in young healthy women on low salt diet. // *Kidney & blood pressure research*. 37 (2013); 432-442 (članak, znanstveni).
- 3) Yue, Lili; Bian, Jing-Tan; Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Phillips, Shane A.; Makino, Ayako; Mazzone, Theodore. Apolipoprotein E Enhances Endothelial-NO Production by Modulating Caveolin 1 Interaction With Endothelial NO Synthase. // *Hypertension (Dallas, Tex.)*. 60 (2012) , 4; 1040-1046 (članak, znanstveni).

#### **Znanstveni radovi u drugim časopisima:**

- 1) Drenjancevic, Ines; Grizelj, Ivana; Harsanji-Drenjancevic, Ivana; Cavka, Ana; Selthofer-Relatic, Kristina. The interplay between sympathetic overactivity, hypertension and heart rate variability. // *Acta Physiologica Hungarica*. 101 (2014); 129-142 (pregledni rad, znanstveni).
- 2) Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Phillips, Shane A. Vascular Dysfunction and Exercise. // *Periodicum biologorum*. 116 (2014), 1; 15-19 (članak, znanstveni).
- 3) Čavka, Ana; Tadžić, Refmir; Grizelj, Ivana; Unfirer, Sanela; Mihaljević, Zrinka; Mihalj, Martina; Manojlović, Dragan; Drenjančević, Ines. Endotelna funkcija – funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. // *Medicinski vjesnik*. (2012) (rad u postupku objavljivanja).



### **Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisima:**

- 1) Cosic, Anita; Novak, Sanja; Cavka, Ana; Mihalj, Martina; Mihaljevic, Zrinka, Grizelj, Ivana; Jelakovic, Bojan; Drenjancevic, Ines. Influence of high salt diet on HIF-1alfa and antioxidative enzymes mRNA expression in blood vessels of young male Sprague-Dawley rats // Journal of Hypertension, ESH-ISH Hypertension 2014, Abstract Book. 2014. e519 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).
- 2) Čavka, Ana; Novak, Sanja; Mihaljević, Zrinka; Grizelj, Ivana; Ćosić, Anita; Lončarić, Zdenko; Popović, Brigita; Drenjančević, Ines. Reduced dietary zinc and selenium levels impairs vascular function via oxidative stress in Sprague-Dawley rats aortas // Acta Physiologica Volume 211, Issue Supplement s697. 2014. 51-S4-E6 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 3) Ćosić, Anita; Mihaljević, Zrinka; Kibel, Dijana; Novak, Sanja; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines. The effect of hyperbaric therapy on the levels of oxidative stress // Acta Physiologica Volume 211, Issue Supplement s697. 2014. 166-P12.3 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 4) Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Mihaljevic, Zrinka; Drenjancevic, Ines. The influence of high salt intake on vascular responses of middle cerebral arteries to flow-induced dilation of Sprague-Dawley rats // Journal of Hypertension, ESH-ISH Hypertension 2014, Abstract Book. 2014. e217 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).
- 5) Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina, Drenjančević, Ines. Adipocytokines and inflammation as a link between obesity and related endothelial dysfunction // Acta Physiologica Volume 211, Issue Supplement s697. 2014. 130-P9.10 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 6) Cavka, Ana; Cosic; Anita; Rasic, Lidija; Grizelj, Ivana; Jelakovic, Bojan; Koller, Akos; Drenjancevic, Ines. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2 derived prostaglandins alters microvascular reactivity during high salt loading in young healthy humans // Journal of Hypertension Volume 31 e-Supplement A / Zanchetti, A (ur.). London, UK : Lippincott Williams&Wilkins, 2013. e223-e223 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

- 7) Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Cosic, Anita; Koller, Akos; Jelakovic, Bojan; Lombard, Julian H; Phillips, Shane A; Drenjancevic, Ines. The Effects of AT1 Receptor Blockade on Skin Microcirculatory Blood Flow and Thromboxane A2 (TXA2) Production in Young Healthy Women // The FASEB Journal 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald (ur.). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 898.14 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 8) Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Goslawski, Melissa; Drenjancevic, Ines; Bian, Jing-Tan; Phillips, Shane A. Influence of Short-term High Salt Diet and Acute Exercise on Microvascular Reactivity in Humans // The FASEB Journal 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald (ur.). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 898.13 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 9) Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Bian, Jing-Tan; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Role of K-Channels in Microvascular Flow- Induced Dilation of Subcutaneous and Visceral Arterioles in Human Obesity // The FASEB Journal 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald (ur.). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 898.15 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 10) Robinson, Austin T; Szczurek, Mary; Bian, Jing-Tan; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Phillips, Shane A. Mitochondrial reactive oxygen species contribute to impaired flow-induced dilation in visceral but not subcutaneous adipose tissue resistance arteries in human obesity // The FASEB Journal 2013 ; 27 (Meeting Abstract Supplement) / Weissmann, Gerald (ur.). Bethesda, USA : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2013. 687.11 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 11) Szczurek, Mary; Bian, Jin-Tan; Ranieri, Christine; Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Robinson, Austin; Marsh, Gordon; Phillips, Shane A. Hypocaloric, but not isocaloric, low fat diets improve microvascular nitric oxide dependent vasodilation in obese subjects // Circulation 128. 2013. A17553 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

- 12) Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Bian, Jing-Tan; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Microvascular reactivity in subcutaneous and visceral fat tissue in human obesity // The FASEB Journal (Meeting Abstract Supplement) 2012 ; 26. Miami, FL, USA : Bethesda, MD : Federation of American Societies for Experimental Biology, 2012. 853.28 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 13) Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H; Mihaljević, Ivan; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. Mechanisms of peripheral tissue blood flow influenced by high salt diet in young healthy female human subjects // Abstracts of the 21st European Meeting on hypertension and Cardiovascular Prevention ; u: Journal of Hypertension 29 (2011) (e-Suppl. A). 2011. e196-e196 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 14) Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Begić, Ivana; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H; Mihaljević, Ivan; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. Influence of High Salt Diet on Microvascular Reactivity in Young Healthy Female Human Subjects // Selected abstracts of the 2nd International Symposium on Hypertension November ; u: Kidney and Blood Pressure Research 33 (2010) (6) 413-441 ; 6 / Ines Drenjančević, Ines ; Jelaković, Bojan ; Koller, Akos, editor(s). Karger, 2010. 416-416 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

#### **Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima:**

- 1) Mihaljević, Zrinak; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina; Čavka, Ana; Grizelj, Ivan; Drenjančević, Ines. Alteration of vasorelaxation in response to reduced pO<sub>2</sub> in aortas of diabetic rats – effects of hyperbaric oxygenation // Proceedings of The Physiological Society 31. PCB175 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, stručni).
- 2) Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Mihaljević, Zrinka; Ćosić, Anita; Novak, Sanja; Drenjančević, Ines. Altered aortic reactivity by diabetes mellitus in ovariectomized rats: role of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) // Proceedings of The Physiological Society 31. 2014. C66 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

- 3) Čosić, Anita; Novak, Sanja; Mihalj, Martina, Mihaljević, Zrinka; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Drenjančević, Ines. Effect of high salt diet on expression of antioxidative enzymes, hypoxia anducible factor 1 alpha and cyclooxygenase 1 and 2 in blood vessels of Sprague-Dawley rats // Proceedings of The Ohyiological Society 31. 2014. PCB177 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 4) Grizelj, Ivana; Čavka, Ana; Mihaljević, Zrinka; Čosić, Anita; Novak, Sanja; Drenjančević, Ines. Mechanism of flow-induced dilation of middle cerebral arteries in diabetic Sprague-Dawley rats // Proceedingy of The Physiological Society 31. 2014. C67 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 5) Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Cosic, Anita; Novak, Sanja; Loncaric, Zdenko; Popovic, Brigita; Drenjancevic, Ines. Effects of dietary zinc and selenium on vascular responses to acetylcholine and reduced pO<sub>2</sub> in aortic rings of male Sprague-Dawley rats // Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS. London, UK, 2013. PCD377 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 6) Cavka, Ana; Manojlovic, Dragan; Lucic, Dejana; Grizelj, Ivana; Drenjancevic, ines. Oestrogen has protective effect on acetylcholine induced relaxation of aortic rings in diabetic rats // Periodicum Biologorum Vol 115, Suppl 2/ Vitale, Branko; Drenjancevic, ines (ur.). Zagreb, 2013. 21 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 7) Drenjancevic, Ines; Kibel, Aleksandar; Unfirer, Sanela; Cosic, Anita; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Gros, Mario; Manojlovic, Dragan, Mihaljevic, Zrinka; Mihalj, Martina; Misir, Mihael; Novak, Sanja; Paradzikovic, Ivana. Hyperbaric oxygenaion – the role of EETs // Periodicum Biologorum Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko; Drenjancevic, Ines (ur.). Zagreb, 2013. 26 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 8) Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Cosic, Anita; Novak, Sanja; Drenjancevic, Ines. Vascular responses of middle cerebral arteries to flow-induced dilation of ovariectomized Sprague-Dawley rats // Periodicum biologorum Vol 115, Suppl 2 / Vitale, Branko; Drenjancevic, Ines (ur.). Zagreb, 2013. 28 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

- 9) Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Cosic, Anita; Novak, Sanja; Drenjancevic, Ines. Vascular responses to acetylcholine- and hypoxia-induced dilation of diabetic ovariectomized rats // *Biopolymers & Cell* 2013. Vol. 29. N2 supplementary 1-100 / El'Skaya, Anna V (ur.). Kijev, Ukrajina, 2013. 56-56 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 10) Ivic, Ivan; Novak, Sanja; Cosic, Anita; Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Loncaric, Zdenko; Koller, Akos; Drenjancevic, Ines. Altered vascular response to acetylcholine and reduced pO<sub>2</sub> in isolated carotid arteries in rats fed by chow containing varied zinc and selenium content // *Proceedings of The Physiological Society Proc 37th IUPS*. London, UK, 2013. PCC398 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 11) Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Goslawski, Melissa; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Short-term high salt diet reduces brachial artery endothelial function in the absence of changes in blood pressure // *Artery Research / Cockcroft, J.R., editor(s)*. Oxford, UK : Elsevier, 2012. 198-198 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 12) Grizelj, Ivana, Čavka, Ana; Jelaković, Bojan; Lombard, Julian H; Mihaljević, Ivan; Koller, Akos; Drenjančević, Ines. High salt diet is associated with impaired microvascular reactivity in young healthy female human subjects // *Biopolymers and Cell / El'Skaya, Anna V., editor(s)*. Kijev, Ukrajina, 2011. 76-76 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

**Sažeci u zbornicima skupova:**

- 1) Grizelj, Ivana. Obesity and endothelial dysfunction // *Abstract book: 7th Central European Meeting on Hypertension & 4th Serbian Society of Hypertension Meeting*. 2014. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 2) Cavka, Ana; Grizelj, Ivana; Jelakovic, Bojan; Lombard, Julian H; Mihaljevic, Ivan; Koller, Akos; Seric, Vatroslav; Drenjancevic, Ines. Role of constrictor prostaglandins in high salt diet-induced microvascular dysfunction in humans // *The Annual*

Symposium of the Croatian Physiological Society with International Participation 2012, Book of abstracts. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

- 3) Grizelj, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević, Ines; Zibar, Lada; Puljak, Livia; Ažman, Josip; Usage of models and high-fidelity medical stimulations (HFMS) in clinical skills education at Faculties of Medicine in Croatia // AMEE 2011. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 4) Grizelj, Ivana; Cavka, Ana; Bian, Jing-Tan; Sczcurek, Mary; Nguyen, Van; Drenjancevic, Ines; Phillips, Shane A. Microvascular reactivity in subcutaneous and visceral adipose tissue in human obesity // The Annual Symposium of the Croatian Physiological Society with International Participation 2012, Book of abstracts. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 5) Mihalj, Martina; Grizelj, Ivana; Drenjančević, Ines; Puljak, Livia; Ažman, Josip; Včev, Aleksandar; Mihalj, Hrvoje. Self-perceived preparedness of senior medical students in Croatia for standalone medical practice. Book of Abstracts AMEE 2011. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 6) Grizelj, Ivana; Mihalj, Martina; Drenjančević-Perić, Ines; Begić, Ivana. Use of new teaching tools in clinical skills at Faculty of Medicine Osijek, Croatia // AMEE 2010. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 7) Mihalj, Martina; Grizelj, Ivana; Drenjančević-Perić, Ines; Zibar, Lada. Self-perceived progress in clinical skills performance of medical students and interns during coursework and internship in Osijek, Croatia // AMEE 2010. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
- 8) Begić, Ivan; Čavka, Ana; Grizelj, Ivana; Ivanović, Zrinka; Drenjančević-Perić, Ines. Does baroreflex have any role in the long-term control of blood pressure? //. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

### **Pasivno sudjelovanje na znanstvenim skupovima:**

- 1) 3rd Stroke Prevention in Atrial Fibrillation (SPAF) Academy. Croatian Cardiology Society. 11.-14.04.2013. Osijek, Hrvatska.
- 2) Pre-Congress Symposium: Kidneys, metabolism, environment and sympathetic tone in hypertension. Investigator generated satellite symposia ESH 2013. 10.-12.06.2013. Zagreb, Hrvatska.
- 3) 8th ISABS Conference on Forensic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine. International Society for Applied Biological Sciences. 24.-28.06.2013. Split, Hrvatska

### **Članstvo u znanstvenim društvima i udrugama:**

1. Hrvatsko društvo fiziologa
2. Hrvatsko društvo za hipertenziju