

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**MECHANISMUS VASODILATAČNÍHO ÚČINKU
4-METHYLKATECHOLU *EX VIVO***

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Kateřina Kuzdřalová

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

V Hradci Králové dne

.....

Kateřina Kuzdřalová

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce doc. PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za odborný dohled, ochotné a vstřícné jednání, cenné rady a pomoc s vypracováním mé diplomové práce. Děkuji také Patricii Dias, MSc. za pomoc s experimentální částí. Velké poděkování patří celé mé rodině, zejména rodičům, za obrovskou podporu nejen při psaní práce, ale po celou dobu mého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Kateřina Kuzdřalová

Školitel: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název diplomové práce: Mechanismus vasodilatačního účinku

4-methylkatecholu *ex vivo*

Klíčová slova: potkan, aorta, flavonoidy, 4-methylkatechol, hladký cévní sval, vasodilatace

Flavonoidy jsou řazeny do skupiny polyfenolických bioaktivních látek vyskytujících se hojně v rostlinách, ovoci a zelenině. Díky svým farmakologickým i biochemickým účinkům hrají klíčovou roli pro lidské zdraví, především v prevenci řady chorob – metabolický syndrom, osteoporóza, ateroskleróza a také onemocnění kardiovaskulárního systému.

Cílem diplomové práce bylo zjistit mechanismus vasorelaxačního účinku jednoho z důležitých metabolitů flavonoidů – 4-methylkatecholu. Pro výzkum byla využita standardizovaná *ex vivo* metoda na izolovaných kroužcích aorty potkana kmene Wistar. Podařilo se nám potvrdit vasodilatační účinky 4-methylkatecholu. Potvrdili jsme také fakt, že metabolit flavonoidů přímo ovlivňuje hladký cévní sval.

Dále jsme zjistili, že námi testovaná sloučenina potencuje vasodilatační aktivitu nitroprusidu sodného a forskolinu a že vasodilatace závisí na aktivitě napěťově řízených membránových kanálů K_v , zejména podtypu K_v7 . Naopak jsme vyloučili přímý účinek 4-methylkatecholu na membránové kanály BK_{Ca} , K_{ir} a K_{ATP} . Rovněž jsme vyloučili přímou aktivaci solubilní guanylátcyklázy a proteinkinázy G v hladkém svalu.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Kateřina Kuzďalová

Supervisor: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The mechanism of vasodilation effect of
4-methylcatechol *ex vivo*

Keywords: rat, aorta, flavonoids, 4-methylcatechol, vascular
smooth muscle, vasodilation

Flavonoids belong to the group of polyphenolic bioactive substances found abundantly in plants, fruits and vegetables. Thanks to their pharmacological and biochemical effects, they play a crucial role for human health, especially in the prevention of numerous diseases – metabolic syndrome, osteoporosis, atherosclerosis and also diseases of a cardiovascular system.

The aim of the diploma thesis was to determine the mechanism of the vasorelaxant effect of one of the most important metabolites of flavonoids – 4-methylcatechol. For the research we used a standardized *ex vivo* method on isolated Wistar rat aortic rings. We were able to confirm the vasodilatory effects of 4-methylcatechol. We also confirmed the fact that the flavonoid metabolite directly affects a vascular smooth muscle.

Furthermore, we found that the tested compound potentiates the vasodilatory activity of sodium nitroprusside and forskolin, and that vasodilation depends on the activity of voltage-gated membrane K_v channels, especially the K_v7 subtype. On the other hand, we excluded a direct effect of 4-methylcatechol on membrane channels BK_{Ca} , K_{ir} and K_{ATP} . We also excluded direct activation of soluble guanylate cyclase and protein kinase G in smooth muscle.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK	8
2. ÚVOD	12
3. TEORETICKÁ ČÁST	13
3.1. Cévní systém	13
3.2. Vasokonstriční faktory	20
3.3. Vasodilatační faktory	22
3.4. Regulační mechanismy vasokonstrikce a vasodilatace	23
3.4.1. Lokální regulace	24
3.4.1.1. Endotelová regulace	24
3.4.1.1.1. <i>Dysfunkce endotelu</i>	29
3.4.1.2. Myogenní regulace	30
3.4.1.3. Enzymová regulace	30
3.4.2. Centrální regulace	33
3.4.2.1. Hormonálně-neurogenní regulace	33
3.5. Role iontových kanálů	39
3.6. Choroby kardiovaskulárního systému	44
3.6.1. Rizikové faktory	45
3.7. Flavonoidy	46
3.7.1. Farmakologické účinky flavonoidů.....	48
3.7.2. Metabolismus flavonoidů.....	50
3.7.3. 4-methylkatechol.....	54
4. CÍL PRÁCE	56
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	57
5.1. Použitý materiál	57
5.1.1. Laboratorní přístroje a pomůcky	57
5.1.2. Chemikálie	59
5.1.3. Zvířata	61
5.2. Metodika	62
5.2.1. Krebsův živný roztok	62
5.2.2. Vlastní experiment	63
5.2.3. Výsledky.....	71

6. DISKUZE	81
7. ZÁVĚR	86
8. LITERATURA.....	87
9. SEZNAM OBRÁZKŮ	97
10. SEZNAM TABULEK.....	98

1. SEZNAM ZKRATEK

A – adrenalin

AA – arachidonová kyselina

AC – adenylátcykláza

ACE – angiotensin konvertující enzym (*angiotensin converting enzyme*)

ADH – antidiuretický hormon (vasopresin)

Ach – acetylcholin

ANP – atriový (atriální) natriuretický peptid

AP – angina pectoris

AT1 – angiotensin I

AT2 – angiotensin II

AT₁ receptor – receptor pro angiotensin II

ATP – adenosintrifosfát

BDNF – mozkový neurotrofický faktor (*brain-derived neurotrophic factor*)

BK_{Ca} – velký vápníkem aktivovaný draselný kanál (*big calcium-activated potassium channel*)

BNP – B-natriuretický peptid (B – *brain*, mozkový)

B2R – receptor pro bradykinin

Ca²⁺ – vápenaté kationty

CaM – kalmodulin

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

cGMP – cyklický guanosinmonofosfát

Ca_v (VGCC) – napětově řízený vápníkový kanál (*voltage-gated calcium channel*)

CNP – C-natriuretický peptid

CNS – centrální nervový systém

CO₂ – oxid uhličitý

COMT – katechol-O-methyltransferáza

COX-1 – cyklooxygenáza 1

COX-2 – cyklooxygenáza 2

DAG – diacylglycerol

DHPAA – 3,4-dihydroxyfenylactová kyselina (*3,4-dihydroxyphenylacetic acid*)

DMSO – dimethylsulfoxid

DRC – křivka *dávka-účinek* (*dose-response curve*)

EC₅₀ – koncentrace navozující 50% efekt

EDRF – od endotelu odvozený relaxační faktor (*endothelium-derived relaxing factor*)

eNOS – endoteliální NO-syntáza

ET-1, ET-2, ET-3 – endotelin 1, 2, 3

G_s, G_q, G_i – receptor spojený s G proteinem

GC – guanylátcykláza

GDP – guanosindifosfát

GTP – guanosintrifosfát

5-HT – 5-hydroxytryptamin (serotonin)

5-HT receptor – serotoninový receptor

ICHS – ischemická choroba srdeční

IK_{Ca} – střední vápníkem aktivovaný draselný kanál (*intermediate-conductance calcium-activated potassium channel*)

IM – infarkt myokardu

IP receptor – receptor pro prostacyklin PGI₂

IP₃ – inositol-1,4,5-trifosfát

IP₃R – inositol-1,4,5-trifosfátový receptor

K_{ATP} – draselný kanál řízený ATP

K_{ir} – draselný kanál usměrněný dovnitř (*inward-rectifier potassium channel*)

K_v – napětově řízený draselný kanál (*voltage-gated potassium channel*)

LDL – lipoprotein s nízkou hustotou (*low-density lipoprotein*)

5-LOX – 5-lipoxygenáza

4-MC – 4-methylcatechol

MLCK – lehkoreťezcová myozinkináza (*myosin light chain kinase*)
MP – lehkoreťezcová myozinfosfatáza (*myosin light chain phosphatase*)
MR – mineralokortikoidní receptor
M receptor – muskarinový receptor
NA – noradrenalin
NCX – sodno-vápenatý výměník (*sodium-calcium exchanger*)
NGF – nervový růstový faktor (*nerve growth factor*)
NO – oxid dusnatý
N receptor – nikotinový receptor
NTS – nitroprusid sodný
O₂ – kyslík
p.a. – pro analysis
pGC – membránová guanylátcykláza (*particulate guanylyl cyclase*)
PGE₂ – prostaglandin E₂
PGG₂ – prostaglandin G₂
PGH₂ – prostaglandin H₂
PGI₂ – prostaglandin I₂ (prostacyklin)
PI₃K – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kináza
PIP₂ – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PIP₃ – fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát
PKA – proteinkináza A
PKC – proteinkináza C
PKG – proteinkináza G
PLA₂ – fosfolipáza A₂
PLC – fosfolipáza C
PMCA – Ca²⁺ ATPáza na plazmatické membráně (*plasma membrane Ca²⁺ ATPase*)
RAA/RAS – renin-angiotensin-aldosteronový systém
RhoA – GTPáza patřící do Ras nadrodiny (*Ras homolog family member A*)

ROCK – ROCK kináza (*Rho-associated protein kinase*)
ROS – reaktivní formy kyslíku
RyR – ryanodinový receptor
SERCA – Ca²⁺ ATPáza (*sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase*)
sGC – rozpustná (solubilní) guanylátcykláza (*soluble guanylyl cyclase*)
SK_{Ca} – malý vápníkem aktivovaný draselný kanál (*small-conductance calcium-activated potassium channel*)
SR – sarkoplazmatické retikulum
TP receptor – receptor pro tromboxan TxA₂
TRP – kanál s přechodným receptorovým potenciálem (*transient receptor potential channel*)
TxA₂ – tromboxan A₂
VEFG – vaskulární endotelový růstový faktor
VNS – vegetativní nervový systém

2. ÚVOD

Onemocnění kardiovaskulárního systému patří svou incidencí, závažností a dopady na celkový zdravotní stav obyvatelstva mezi velmi závažné problémy lidské populace (Klener et al. 2012, Štejfá et al. 2007).

Incidence kardiovaskulárních onemocnění narůstá zejména vlivem různých rizikových faktorů, mezi něž můžeme zařadit genetické predispozice, životní styl, vysoký krevní tlak, diabetes mellitus, dyslipidémii, obezitu či kouření (Ciumărnean 2020).

Kardiovaskulární systém je jedním ze základních předpokladů pro udržení stálosti vnitřního prostředí při měnících se metabolických potřebách organismu, a to i v případě neustálých změn podmínek okolního prostředí (Rokyta et al. 2000).

Nejdůležitější úlohou tohoto systému je zajistit cirkulaci krve v potřebném množství a za konkrétních aktuálních požadavků do všech tkání a orgánů (Mourek 2012).

Polyfenolické sloučeniny jako sekundární metabolity rostlinných zástupců jsou v přírodě bohatě rozšířené (Jucá et al. 2020). Tyto látky také tvoří důležitou složku potravy – vyskytují se v různých druzích ovoce i zeleniny, pochutinách (čokoláda, ořechy, semínka) i nápojích (čaj, káva, červené víno). Řada výzkumů potvrdila pozitivní vliv pravidelné konzumace stravy s obsahem flavonoidů na snížení kardiovaskulárního rizika. Konkrétní skupinou polyfenolů významnou především pro své antioxidační, protizánětlivé, antimutagenní, antitrombotické účinky a schopnost vychytávat volné radikály jsou flavonoidy (Agrawal 2011, Gross 2004, Kumar a Pandey 2013, Ullah et al. 2020). Působí proti nadměrné lomivosti cév a jsou schopné stabilizovat propustnost cévní stěny. Pro kardiovaskulární systém je stěžejní především antihypertenzní účinek vyplývající z jejich vasodilatační aktivity. Díky celé řadě zmíněných příznivých efektů našly tyto látky uplatnění nejen v medicíně, nutričním poradenství, kosmetickém průmyslu, ale také ve farmacii a jejich terapeutický potenciál je stále předmětem různých výzkumů (Ciumărnean 2020).

Kardioprotektivní působení některých produktů metabolismu flavonoidních sloučenin se stalo námětem této práce.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Cévní systém

Kardiovaskulární systém jako jeden z nejdůležitějších systémů lidského organismu je tvořen dvěma vzájemně propojenými vaskulárními celky – lymfatickým a krevním.

V první řadě zodpovídá za dodávání látek ke tkáním – především kyslíku a látek stěžejních pro správnou výživu a odpadní látky vyprodukované během metabolických procesů odvádí k orgánům zodpovědným za jejich exkreci z těla ven. Neméně důležitou úlohou je rovněž transport hormonů produkovaných žlázami se schopností vnitřní sekrece k cílovým strukturám (Čihák 2016, Konrádová et al. 2000, Petřek 2019).

Cirkulace také přispívá k udržování stálé koncentrace iontů, teploty a zajišťuje stabilitu acidobazické rovnováhy (Rokyta et al. 2000).

Cévní systém je tvořen uzavřeným systémem trubic (cév) a krev jimi proudí díky činnosti srdce (Trojan et al. 2003).

Proud krve tkáněmi je regulován podle okamžité potřeby pomocí vasokonstrikce nebo vasodilatace.

I když se jednotlivé typy cév od sebe liší, základní histologickou stavbu tvoří tři vrstvy – *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia* (Konrádová et al. 2000, Trojan et al. 2003) (*podrobněji viz Obr. 1*).

Tunica intima

Tato vnitřní část cév je složena z endotelu a subendotelu. Endotel (výstelka) tvoří jedna vrstva epitelialních buněk, které zodpovídají za hladký a nesmáčivý vnitřní povrch cév a komunikují s krví (Dylevský 2019, Kachlík 2018).

Důležitou funkcí je antitrombotické působení – zábrana kontaktu mezi krevními destičkami (trombocyty) a subendotelem. Mají i metabolickou aktivitu a ovlivňují přestup buněčných i nebuněčných prvků. V neposlední řadě je endotel zdrojem

vasodilatačních a vasokonstrikčních látek a významně se podílí na regulaci krevního toku (Karásek a Vaverková 2009, Konrádová et al. 2000, Trojan et al. 2003, Zhao et al. 2015).

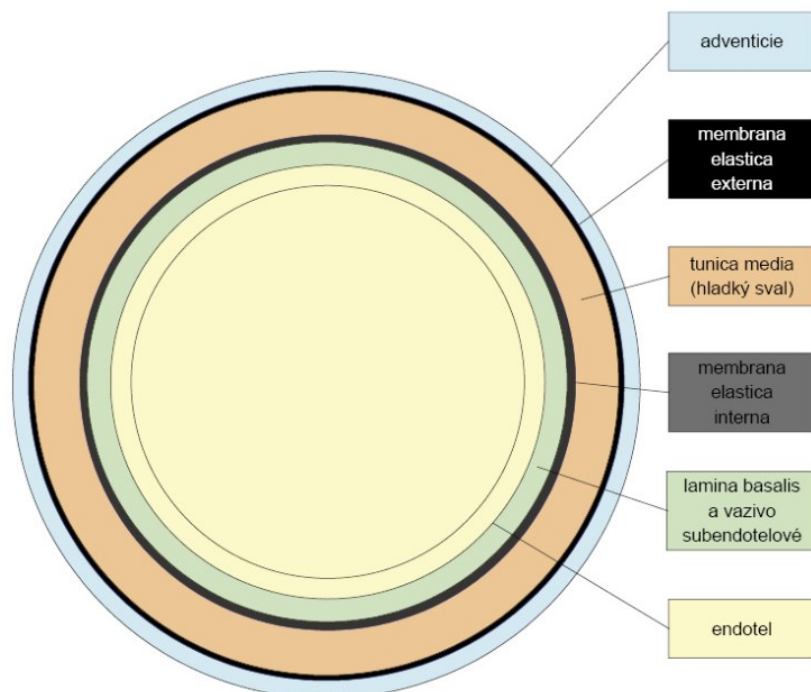
Tunica media

Je tvořena spirálovitě a kruhovitě uspořádanými buňkami hladké svaloviny a má největší podíl na svalové dilataci a kontrakci.

Tunica adventitia (externa)

Obsahuje zejména kolagenní vazivo, fibroblasty a tukové i hladkosvalové buňky (Konrádová et al. 2000, Vajner et al. 2017).

Nervové zásobení cévy je zajištěno především v *tunica media* bohatě větvenou sítí vláken autonomního nervového systému (Čihák 2016, Konrádová et al. 2000).



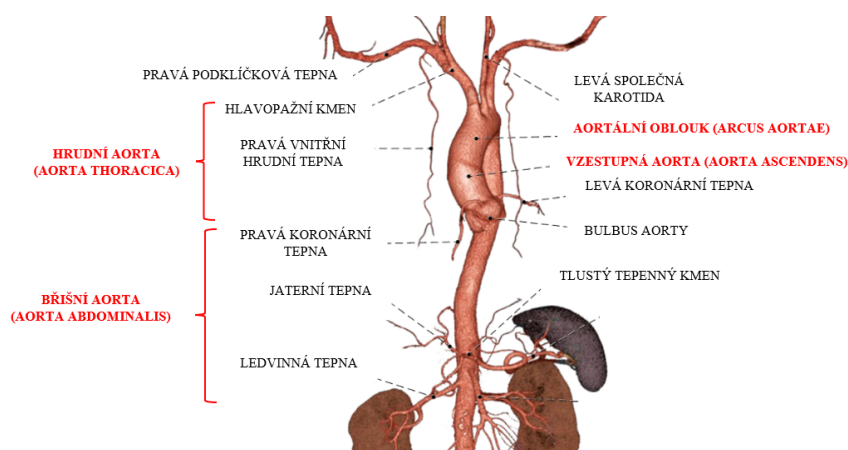
Obrázek 1 - Struktura cévní stěny

Převzato z: Kittnar et al. (2021)

Krevní cévy můžeme podle funkce a histologické struktury rozdělit na artérie, malé arterioly přecházející postupně ve strukturu kapilár, z kapilárních sítí postupně vzniká žilní část cirkulačního systému – venuly, jež se následně sbírají ve větší vény. Dalšími kategoriemi cév jsou také arteriovenózní zkraty a prekapilární sfinktery (Čihák 2016, Dylevský 2019, Konrádová et al. 2000, Shier et al. 2016, Vajner et al. 2017).

V experimentální části této diplomové práce byla použita izolovaná aorta (srdečnice).

Touto elasticou tepnou o velké kapacitě (u člověka průměru přes 3 cm) je tvořen první arteriální úsek systémového krevního oběhu (*viz Obr. 2*). Mechanické vlastnosti aorty jsou výrazně určeny obsahem kolagenu a elastinu. Vnitřní vrstva je stejně jako u všech ostatních cév tvořena jednou vrstvou endotelových buněk. Střední vrstvu tvoří elastická a kolagenní vlákna, fibrily a hladkosvalové buňky uspořádané do komplexu trojrozměrné sítě. Vnější vrstva tvořená fibrocyty a fibroblasty je navíc obklopena volnou vrstvou pojiva zodpovědného za ukotvení aorty v jejím okolí (Gasser 2017).



Obrázek 2 - Lidská aorta - jednotlivé části a větvení

Převzato z: Grim et al. (2017)

Pro vasodilataci nebo vasokonstrikci je zásadní činnost hladkého cévního svalu (Konrádová et al. 2000).

Tento typ svaloviny najdeme ve všech cévách kromě kapilár a také ve stěnách útroh (Trojan et al. 2003).

Hladká a příčně pruhovaná svalovina se v určitých rysech shodují, v jiných se ale významně liší. Buňka je považována za základní stavební a funkční jednotku hladké a srdeční svaloviny, zatímco struktura příčně pruhovaného kosterního svalstva je tvořena vlákny (Dylevský 2019). Buňky hladkého svalu jsou poměrně malé, pouze s jedním jádrem a nemají ve struktuře prvky příčného pruhování. Kolem každé jednotlivé buňky najdeme bazální laminu a síť tvořenu retikulárními vlákny (Balko et al. 2016, Junqueira et al. 1997, Shier et al. 2016).

Díky činnosti jemných myofibril má svalstvo (hladké i kosterní) schopnost aktivní kontraktility. Zkrácení může být vyvoláno konkrétním nervovým podnětem (Dylevský 2019). Kontrakce hladkého svalu probíhá zpravidla pomalu a je neovlivnitelná vůlí. Podstatným funkčním rozdílem je skutečnost, že přestože kontrakce nastává pomaleji, tak trvá podstatně delší dobu, což je zásadní pro nepřetržité udržení funkční kontraktility. Hladká svalová vlákna se na rozdíl od příčně pruhované svaloviny umí podstatně více zkrátit, s tím souvisí také schopnost velké roztažnosti (Junqueira et al. 1997, Kittnar et al. 2021, Konrádová et al. 2000, Trojan et al. 2003).

V zásadě můžeme rozlišit dva typy hladkého svalstva – jednotkový a vícejednotkový.

První typ je tvořen větším počtem vzájemně úzce spojených buněk, jež tímto vytváří soubuní (*syncytium*). Duté orgány mají své stěny tvořené tímto typem hladkého svalu, a proto se pro něj používá označení hladké svalstvo útrobní. Typickým rysem útrobních svalů je schopnost pohybovat se nezávisle na nervových podnětech a mohou být ovládány nejen činností vegetativního nervového systému, ale také působením různých vlivů – hormonálních, reflexních i látkových (Petřek 2019, Rokyta et al. 2000, Shier et al. 2016).

Vícejednotkový hladký sval je oproti jednotkovému složen z většího počtu samostatných buněk chovajících se na sobě nezávisle, každá z těchto buněk díky vlastnímu nervovému zásobení vykazuje schopnost sama se aktivně kontrahovat. Svaly nejsou schopny pohybu spontánně bez nervového podnětu, jsou aktivovány pomocí vzruchů a řízeny jsou výhradně mechanismy vegetativního nervového systému (Dylevský 2019, Petřek 2019, Rokyta et al. 2000).

V cytoplazmě hladkosvalových buněk se vyskytují aktinová a myozinová myofilamenta. Strukturou dvojité šroubovice aktinu obtočené tropomyozinovými molekulami je vytvořen základ tenkých myofilament, touto stavbou se myofilamenta podobají struktuře svalu příčně pruhovaného. Tlustá myofilamenta obsahují myozin, čímž i zde můžeme najít obdobnou strukturu jako v příčně pruhované svalovině, rozdílnost však spočívá v odlišných typech myozinu. Myozinová filamenta v kosterním svalu mají hlavičky vytvořeny terminálně, v případě hladkého svalstva jsou však hlavičky myozinu rozloženy po celé délce myofilamenta (Junqueira et al. 1997, Konrádová et al. 2000).

Mechanismus kontrakce a relaxace hladkého svalu

Pro aktivní kontrakci je důležitým předpokladem struktura a organizace filament aktinu a myozinu. Pro tvorbu komplexu myozinu s aktinem je důležitá část myozinové hlavičky, jelikož ta má k aktinu nejvyšší afinitu. K samotné kontrakci dochází podobně jako ve vláknu svalu kosterního klouzavým pohybem jednotlivých myofilament a vznikem aktinomyozinového komplexu. V tomto svalovém typu však není troponin a průběh kontrakce je odlišný od mechanismu kontrakce svalu srdečního nebo kosterního (Junqueira et al. 1997, Klabunde 2019a, Lüllmann-Rauch 2012, Trojan et al. 2003).

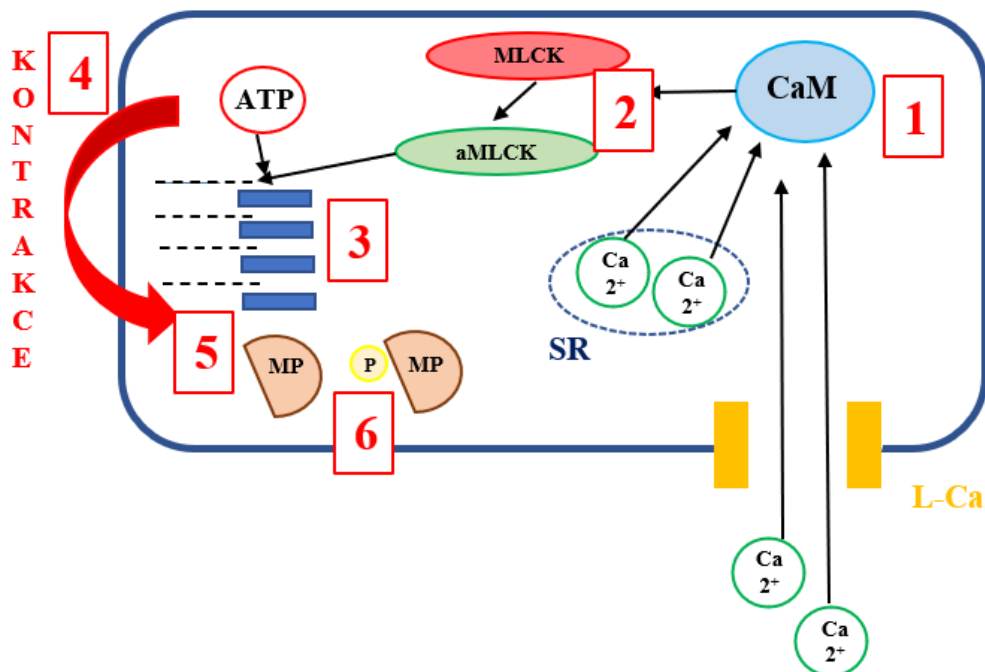
Pro odstartování kontrakce je stěžejním krokem vzestup koncentrace vápenatých kationtů v cytoplazmě. Ke zvýšení koncentrace těchto iontů v buňce může dojít jak vstupem vápníku z extracelulárního prostoru, tak jeho uvolněním z buněčných zásob – sarkoplazmatického retikula (Trojan et al. 2003). Vtok vápníku dovnitř buňky je umožněn zejména napětově řízenými vápníkovými kanály typu L (Brozovich et al. 2016). Dalším důležitým činitelem je kalmodulin jako náhrada chybějícího troponinu (Klabunde 2019a). Vápenaté kationty dokážou s kalmodulinem vytvořit komplex.

Dalším krokem je aktivace lehkotěžcové kinázy myozinu (MLCK) a ta zajistí aktivování myozinu připojením fosfátové skupiny (fosforylací) získané štěpením molekuly ATP. Aktivita MLCK je ovlivňována řadou různých faktorů a tím je ovlivněn také stupeň samotné kontrakce (Junqueira et al. 1997, Shier et al. 2016,

Trojan et al. 2003). Svalová kontrakce je umožněna interakcí aktivního myozinu s aktinem.

Za odstranění skupiny fosfátu z myozinové struktury (defosforylaci) zodpovídá enzym lehkotěžcová myozinfosfatáza (MP). Tímto krokem se vrátí celá situace do výchozího bodu a dojde ke svalové relaxaci. Celý mechanismus je podrobně zobrazen na *Obr. 3*.

Hlavními faktory, jež zprostředkovávají vasokonstrikci, jsou kromě vápenatých kationtů dále také proteinkináza C a systém RhoA/ROCK. Opačně působí proteinkináza A a proteinkináza G. Pohyb jednotlivých důležitých iontů do buňky a z buňky příslušnými iontovými kanály ovlivňuje rozdíl potenciálů mezi vnější a vnitřní stranou membrány hladkosvalové buňky. Za klidového stavu je hodnota membránového potenciálu přibližně -50 až -40 mV. Změna rozdílu potenciálů – *hyperpolarizace* (posun k zápornější hodnotě) a *depolarizace* (posun k méně negativní hodnotě) – jsou významnými faktory ovlivňující proces kontrakce a relaxace (Gao 2017, Gurney a Clapp 1994).



Obrázek 3 - Schéma kontrakce hladkého cévního svalu

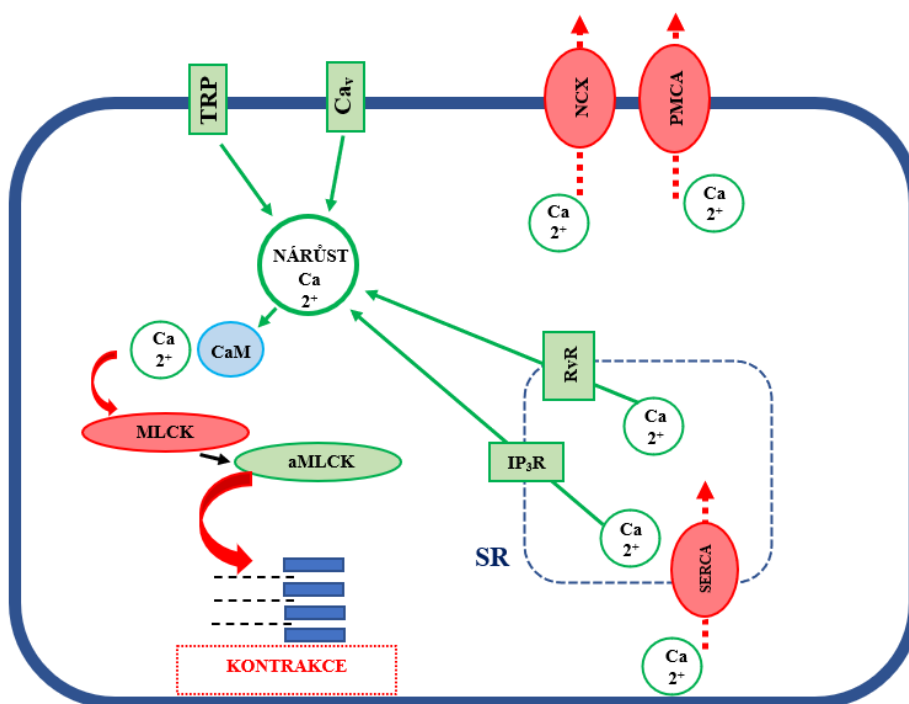
Vzestup koncentrace vápenatých kationtů (Ca^{2+}) umožněn influxem přes L-*typ* napětově řízených vápníkových kanálů (L-Ca) a uvolněním ze zásobních buněčných organel – sarkoplazmatického retikula (SR), vytvoření komplexu mezi vápníkem a kalmodulinem (CaM) (1), aktivovaný kalmodulin přemění lehkoreťezcovou myozinkinázu z neaktivní formy (MLCK) na aktivní (aMLCK) (2) – ta následně připojením fosfátové skupiny k myozinu zajistí jeho aktivaci (3). Interakcí mezi myozinem a aktinem je navozená kontrakce svalu jako výsledek celého procesu (4). Lehkořetězcová myozinfosfatáza (MP) odstraněním fosfátové skupiny z myozinu způsobí opačný děj – relaxaci (5). Procesem fosforylace je enzym myozinfosfatáza přeměněn na neaktivní formu (6).

Převzato a upraveno z: Mladěnka (2018)

3.2. Vasokonstriční faktory

Vápenaté kationty (Ca^{2+})

Za klidového membránového potenciálu je koncentrace vápníku podstatně vyšší (dvacet až třicet tisíckrát) ve vnějším prostředí buňky oproti její cytoplazmě. Nízká koncentrace vápenatých kationtů v buňce je udržována na plazmatické membráně činností Ca^{2+} ATPázy (PMCA) a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníku (NCX) a dále Ca^{2+} ATPázy lokalizované na povrchu sarkoplazmatického retikula (SERCA) (Gao 2017, Ledvina et al. 2009a, Rokyta et al. 2000). Naopak ke zvýšení hladiny těchto kationtů v buňce přispívají aktivní napěťově řízené vápenaté kanály (Ca_v), TRP kanály a nitrobuněčné kanály spojené s IP_3 receptory (IP_3R) a s ryanodinovými receptory (RyR) (viz Obr. 4) (Carafoli a Krebs 2016). Mechanismus aktivace těchto kanálů bude popsán v příslušné kapitole.



Obrázek 4 - Schéma vasokonstriční aktivity vápenatých kationtů

Zelenými šipkami jsou zobrazeny způsoby vzestupu koncentrace vápenatých kationtů v buňce důležité pro navození depolarizace membrány a vyvolání vasokonstrikce.

Převzato a upraveno z: Gao (2017), Katzung (2018)

Proteinkináza C (PKC)

Tato serin/threoninová kináza má nezastupitelnou roli v řadě signálních pochodů (Holzerová 2016). Inaktivní forma je lokalizovaná především v cytosolu, zatímco po aktivaci se přesouvá k plazmatické membráně, do sarkoplazmatického retikula a jiných organel. Může být aktivována mnoha různými podněty – působením hormonů (adrenalin, angiotensin II), růstových faktorů a činností neurotransmiterů. Podstata aktivace spočívá v navázání agonisty na membránový receptor typu G_q , tím nastane aktivace fosfolipázy C (PLC) a ta způsobí hydrolyzu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP_2) lokalizovaného v membráně buněk za vzniku sekundárních poslů – diacylglycerolu (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfátu (IP_3) (Andrea a Walsh 1992, Trojan et al. 2003). DAG je zodpovědný za aktivaci PKC a IP_3 dokáže aktivovat IP_3 receptory na sarkoplazmatickém retikulu, čímž podpoří uvolnění vápníku z nitrobuněčných zásob. Kromě toho může být PKC aktivována fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátem (PIP_3) – vznikajícím při fosforylaci PIP_2 pomocí fosfatidylinositol-3-kinázy (PI_3K). Činnost aktivní PKC vede k depolarizaci plazmatické membrány, zvýšení koncentrace vápenatých kationtů v cytoplazmě buňky hladkého svalu a výsledkem je vasokonstrikce. Celá tato dráha je v dalších kapitolách uváděna schématem G_q - PLC - DAG/IP_3 - PKC (Gao 2017, Ringvold a Khalil 2017).

RhoA/ROCK systém

Tato signální dráha hraje klíčovou roli v mnoha buněčných funkcích (kontraktilita, motilita, buněčná proliferace). Specifická GTPáza označovaná RhoA je dalším významným faktorem podílejícím se na procesu vasokonstrikce. Jestliže má RhoA na sebe navázanou molekulu GDP, je v neaktivní formě. Aktivována může být na podkladě vasokonstrikčních působků ve vnějším prostředí buňky nebo v případě, že je v buňce vyšší koncentrace vápníku se současnou aktivací PI_3K kinázy. Aktivace spočívá ve výměně GDP za GTP. Následně aktivní RhoA aktivuje hlavní efektor této signální dráhy – serin/threoninovou kinázu ROCK. Ta působí několika mechanismy, např. inhibicí fosfatázy lehkého myozinového řetězce MP dokáže zabránit odštěpení fosfátové skupiny ze struktury myozinu, díky tomu může zůstat myozin aktivní a probíhá vasokonstrikce, kromě tohoto je také schopna zabránit aktivaci napět'ově

řízených draselných kanálů a zamezit tím membránové re/hyperpolarizaci (Gao 2017, Seccia et al. 2020, Shimokawa et al. 2016).

3.3. Vasodilatační faktory

Proteinkináza A (PKA = cAMP-dependentní proteinkináza)

Stejně jako PKC patří i proteinkináza A do skupiny serin/threoninových kináz. Jiným označením této kinázy je název *cAMP-dependentní proteinkináza*, protože PKA je závislá na aktivaci právě tímto sekundárním poslem.

Aktivaci PKA navodí řada vasodilatačních látek vazbou na membránový receptor typu G_s . Tím dojde ke stimulaci enzymu adenylátcyklázy (AC), ta katalyzuje cyklizaci ATP a odštěpením difosfátu vzniká cAMP, který aktivuje PKA. Aktivní forma PKA následně fosforyluje cílové struktury. Tato dráha je v dalších kapitolách uváděna jako *G_s -AC-cAMP-PKA*.

Výsledný účinek aktivní PKA spočívá zejména v navození re/hyperpolarizace membrány effluxem draselných kationtů z buňky, v poklesu koncentrace vápenatých kationtů v cytoplazmě hladkosvalové buňky a následně ve vasodilataci. PKA má také schopnost zvýšit aktivitu SERCA a tím potencovat vychytávání vápníku do sarkoplazmatického retikula. Vasokonstriční aktivitu potlačuje mimo jiné i inhibicí IP_3R na sarkoplazmatickém retikulu, čímž brání uvolnění vápníku z buněčných zásob. Důležitým mechanismem je také přeměna aktivní formy RhoA na neaktivní výměnou GTP za GDP, tímto krokem tedy inhibuje PKA vasokonstriční účinky RhoA/ROCK systému zmíněného v předchozí kapitole (Braune et al. 2020, Gao 2017, Ledvina et al. 2009b, Mladěnka 2018, Ramanlal et al. 2022, Rokyta et al. 2000).

Proteinkináza G (PKG = cGMP-dependentní proteinkináza)

Tato proteinkináza je efektozem cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), přičemž za vznik sekundárního posla cGMP z GTP zodpovídá guanylátcykláza (GC) dvojího typu – pGC vázaná v buněčné membráně nebo solubilní guanylátcykláza (sGC) aktivovaná pomocí NO z buněčného endotelu (Francis et al. 2010, Schramm et al.

2018). Rozlišujeme dva typy PKG – PKGI nacházející se především v cytoplazmě (pro vasodilataci významnější) a PKGII v plazmatické membráně buňky. PKGI je především v hladkosvalových buňkách, v krevních destičkách a v plicích, zatímco PKGII je typická v gastrointestinálním traktu, ledvinách nebo mozku.

Aktivní PKG fosforyluje různé cílové struktury a tak ovlivňuje řadu buněčných procesů – zodpovídá za relaxaci hladkého svalstva cévního i svalstva v gastrointestinálním traktu, kromě toho inhibuje aktivaci a adhezi trombocytů a buněčné dělení.

Podobně jako kaskáda PKA, i signální kaskáda PKG přispívá k membránové re/hyperpolarizaci a vasodilataci mnoha mechanismy – aktivací draselných kanálů potencuje efflux draselných kationtů, snižuje aktivitu RhoA/ROCK systému, inhibuje influx vápenatých kationtů do buňky a snižuje celkově citlivost myofilament vůči vápenatým kationtům (Francis et al. 2010, Gao 2017, Gurney a Clapp 1994, Katzung 2018).

3.4. Regulační mechanismy vasokonstrikce a vasodilatace

Souhra regulačních mechanismů je nezbytným předpokladem pro funkčnost celého kardiovaskulárního systému. Jednak je potřeba regulovat krevní tlak tak, aby byly pokryty aktuální požadavky tkání a orgánů na dostatečné prokrvení, přičemž požadavky se mění v závislosti na konkrétní části organismu a konkrétní situaci. Dalším podstatným úkolem je zajistit tok krve správným směrem a zachovat tak hlavní princip celé oběhové soustavy (Langmeier et al. 2009, Trojan et al. 2003).

Základní regulační mechanismy ovlivňující tonus cévního svalstva dělíme na centrální důležité pro zachování správné aktivity kardiovaskulárního systému jako celku a místní (lokální) potřebné k regulaci průtoku krve daným místem vasokonstrikcí nebo vasodilatací (Kittnar a Mlček 2009, Trojan et al. 2003).

Z hlediska časového se dělí řízení krevního oběhu na regulační změny probíhající rychle nebo pomalu (Mourek 2012).

Rychlé mechanismy jsou změny umožněné činností nervového systému – především prostřednictvím signálů z vysokotlakových baroreceptorů karotického sinu a aortálního oblouku. Pokud je krevní tlak vysoký, dojde k aktivaci těchto receptorů a následně k rychlému poklesu srdeční frekvence inhibicí sympatiku a aktivací parasympatiku (Mourek 2012, Vlček et al. 2010). Mezi pomalé neboli dlouhodobé mechanismy regulace patří působení hormonu vasopresinu a také aldosteronu (Rokyta et al. 2000).

3.4.1. Lokální regulace

V experimentální části diplomové práce pracuji s izolovanou cévou, a proto se nyní zaměřím na lokální regulaci (označovanou také jako autoregulace). Mezi lokální regulační mechanismy patří regulace endotelová, enzymová a hormonálně-neurogení, tato poslední je rovněž částečně zprostředkovávána i centrálními mechanismy (*viz následující kapitola 3.4.2.*).

3.4.1.1. Endotelová regulace

Jak již bylo zmíněno, cévní endotel má dvě základní schopnosti – působí jako antitrombotická bariéra a vylučuje vasoaktivní působky (vasodilatační i vasokonstrikční), které účinkují autokrinně i parakrinně.

Pokud však dojde k narušení jeho funkčnosti (*viz následující kapitola 3.4.1.1.1.*), hovoříme o endotelové dysfunkci, která se významně podílí na rozvoji různých kardiovaskulárních chorob (Štejfa et al. 2007, Trojan et al. 2003).

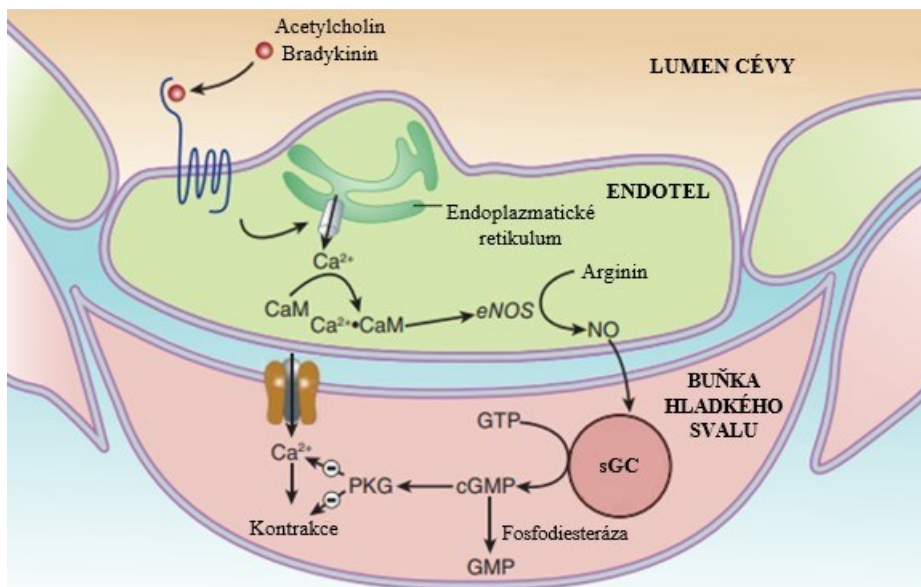
NO (oxid dusnatý)

Za tvorbu tohoto vasodilatačního působku z aminokyseliny *L-argininu* zodpovídá enzym endoteliální NO-syntáza (eNOS). Tvorba a následné uvolnění NO mohou být vyvolány na základě stimulace endotelu mnoha různými mediátory jako jsou např. bradykinin nebo acetylcholin (Katzung 2018, Rokyta et al. 2000). NO je často

označován zkratkou *EDRF* neboli z endotelu odvozený relaxační faktor (Trojan et al. 2003). Dnes je již jasné, že NO je pouze prvním identifikovaným mezi mnoha dalšími EDRF.

Oxid dusnatý je v těle zodpovědný i za řadu dalších dějů (Katzung 2018). Kromě kardiovaskulárního systému je funkčním prvkem také pro nervový nebo imunitní systém (Zhao et al. 2015).

Vasodilatační účinek (*viz Obr. 5*) je spuštěn difuzí NO z endotelu do buňky hladkého svalů a navázáním na rozpustnou guanylátcyklázu (sGC). Tímto krokem dojde k zahájení již popsané kaskády – vzroste koncentrace cGMP a je aktivována PKG. Následně je zablokováno uvolnění vápenatých kationtů z nitrobuněčných zásob a nemůže být aktivována MLCK; bloádou RhoA/ROCK systému je zvýšena aktivita MP; aktivace draselných kanálů způsobí efflux draslíku a tím nastane hyperpolarizace buněčné membrány (Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000, Silbernagl a Lang 2001, Zhao et al. 2015). Naopak nedostatek oxidu dusnatého vede k převaze vasokonstrikčně působících endoteliálních faktorů, především endotelinu ET-1 (Rokyta et al. 2000). Významné jsou také antimitotické působení na buňky hladkého svalstva a antitrombotická aktivita. NO podporuje proces fibrinolýzy a tím zabraňuje nadměrné srážlivosti krve. Klíčovou úlohou je rovněž funkce neurotransmiteru (Katzung 2018).



Obrázek 5 - Vasodilatační aktivita oxidu dusnatého

K uvolnění kationtů vápníku ze zásob buňky endotelu může dojít např. činností na endotelu závislých mediátorů – bradykininu, acetylcholinu. Interakcí vápníku s kalmodulinem vzniká komplex (CaM) a ten zajistí aktivaci enzymu endoteliální NO-syntázy (eNOS). Prekurzorem pro syntézu NO je aminokyselina L-arginin. Vytvořený NO za současného vzniku cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) z guanosintrifosfátu (GTP) způsobí aktivaci rozpustné guanylátcyklázy (sGC). cGMP aktivací proteinkinázy G (PKG) zablokuje influx vápenatých kationtů do cytoplazmy buňky a zabrání tak kontrakci (navodí dilataci).

Modifikováno podle: Katzung (2018)

Prostanoidy

Jako prostanoidy označujeme několik lokálně působících látek, jejich syntéza probíhá kaskádou enzymatických reakcí z kyseliny arachidonové (AA), která je součástí fosfolipidové membrány buněk. Deriváty této esenciální polynenasycené mastné kyseliny souhrnně označujeme jako eikosanoidy a prostanoidy jsou podskupinou těchto sloučenin (Katzung 2018, Ledvina et al. 2009a, Zhu et al. 2020).

Enzym cyklooxygenáza (COX) zahajuje jednu z metabolických drah kyseliny arachidonové vedoucí ke tvorbě nestabilního endoperoxidu prostaglandinu G₂ (PGG₂),

z něj následně vzniká prostaglandin H_2 (PGH_2). Různé typy přítomných enzymů – syntázy a isomerázy umožní sledem mnoha reakcí přeměnit PGH_2 na prostanoidy – prostaglandiny a tromboxan A_2 (TxA_2) (*viz dále*) (Gao 2017, Katzung 2018, Štejfá et al. 2007, Zhu et al. 2020).

V buňkách endotelu jsou přítomny enzymy COX-1 (také PGH syntáza 1) a COX-2 (PGH syntáza 2), přičemž COX-1 zpravidla převažuje a je konstitutivní. Naproti tomu COX-2 je inducibilní a jeho koncentrace v organismu je proměnlivá. Typickou situací, kdy koncentrace COX-2 narůstá, je probíhající zánět. Jeho význam stoupá také s věkem a za patologických podmínek (obezita, diabetes, hypertenze) (Katzung 2018, Mladěnka 2018, Trojan et al. 2003).

Jiná metabolická cesta kyseliny arachidonové (pro kardiovaskulární systém ne tolik zásadní) vede působením enzymu 5-lipoxygenázy (5-LOX) ke vzniku leukotrienů. Tyto působky jsou spojeny se vznikem bolesti a zvýšenou propustností cévní stěny a významně se tedy podílejí na zánětu (Katzung 2018, Štejfá et al. 2007).

Nejvýznamnějším prostanoidem je prostaglandin I_2 (PGI_2 neboli prostacyklin). Za jeho produkci jsou zodpovědné zejména endotelové a částečně i hladkosvalové buňky. Prostaglandin I_2 se váže na membránový IP receptor na buňkách hladkého svalstva, který je spojený s G_s proteinem, a způsobí vasodilataci. Dalším účinkem je schopnost zastavit novotvorbu hladkosvalových buněk a velmi významným efektem je jeho antitrombogenní aktivita. Schopnost velkých cév syntetizovat prostacyklin klesá od *tunica intima* směrem k *tunica adventitia* (Braune et al. 2020, Gao 2017, Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000).

Zásadní je rovněž tvorba prostaglandinu E_2 (PGE_2), jehož vasodilatační působení je obdobně důsledkem vazby na EP_2 receptor (Braune et al. 2020, Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000). PGE_2 navozuje relaxaci hladkého svalstva cév a také bronchů, v případě hladkých svalů dělohy a střev však působí konstriktivně (Silbernagl a Lang 2001).

Oba typy receptorů – IP i EP_2 patří mezi G_s receptory. Jejich stimulací je navozena relaxace hladkého svalstva cév. Proces začíná nárůstem hladiny cAMP, což má dále za následek aktivaci PKA. V dalším kroku dojde k 1) inaktivaci MLCK fosforylací,

čímž je znemožněna aktivní kontrakce, 2) blokáde uvolnění vápníku ze zásob buňky a 3) re/hyperpolarizaci buňky navozené aktivním effluxem draselných kationtů (Braune et al. 2020, Mladěnka 2018).

Syntéza tromboxanu A_2 je zprostředkována převážně krevními destičkami (trombocyty), tvořen je také v buňkách dysfunkčního endotelu (Štejfaj 2007). Působí jako vasokonstriktor a podporuje shlukování destiček. Působením tromboxanu A_2 na TP receptory typu G_q nastane aktivace PKC, zvýšení hladiny vápenatých kationtů uvnitř buňky a výsledkem této signalizační kaskády je navození kontrakce. Můžeme ho najít také v ledvinném glomerulu, kde se jeho vasokonstriční aktivita projeví za patologických podmínek. Ve farmakoterapii jsou využívány látky působící jako inhibitory TP receptorů, aby tak zabránily nadměrné vasokonstrukci a vzniku nebezpečných trombů (Braune et al. 2020, Katzung 2018, Mladěnka 2018, Štejfaj et al. 2007, Zhu et al. 2020).

Prostanoidy hrají úlohu v řadě dalších fyziologických i patologických pochodů v organismu (Braune et al. 2020). Mají kromě výrazného efektu na hladký cévní sval významný vliv také na hladké svalstvo dýchacího, gastrointestinálního, rozmnožovacího systému a v neposlední řadě ovlivňují imunitní systém organismu. V ledvinách hrají prostaglandiny klíčovou roli při zachování krevního tlaku a regulují jejich správnou činnost.

Prostaglandiny svou vasodilatační aktivitou hrají úlohu také při rozvoji zánětu – zvyšují propustnost cévní stěny, podporují krevní průtok danou oblastí, tvorbu otoku a infiltraci postiženého místa leukocyty (Katzung 2018). Z tohoto důvodu jsou v terapii hojně využívána nesteroidní antiflogistika inhibující aktivitu enzymu COX, čímž zablokují celou kaskádu syntézy prostaglandinů (Zhu et al. 2020).

Endotelin

Je to skupina 3 peptidů (isoformy ET-1, ET-2, ET-3) charakteristických svou vasokonstriční aktivitou. Kromě toho mají také účinky proliferační a trombotizující.

- ET-1 – cévní endotel, mozek – neurony a astrocyty centrální nervové soustavy, ledviny

- ET-2 – střeva, ledviny
- ET-3 – střeva, nadledvinky

Nejvýznamnějším endotelinem pro kardiovaskulární systém je typ ET-1, přičemž jeho exprese může být zvýšena činností růstových faktorů nebo cytokinů, stresem, případně dalšími vasoaktivními látkami (Katzung 2018, Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000, Štejfá et al. 2007, Trojan et al. 2003).

Endoteliny stimulují dva typy receptorů – ET_A a ET_B receptory. Afinita k receptoru ET_B je u všech tří izoform endotelinu srovnatelná, avšak efektivita ET-3 na receptoru ET_A je výrazně nižší oproti zbylým dvěma formám (Davenport et al. 2016, Gao 2017).

Stimulací ET_B receptoru v endotelu navodí antiproliferaci a vasodilataci zprostředkovanou uvolněním prostacyklinu a oxidu dusnatého z endotelu, zatímco navázáním na stejný typ receptoru v buňkách hladké svaloviny působí vasokonstrikčně (Katzung 2018, Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000, Štejfá et al. 2007, Trojan et al. 2003).

ET_A receptor v hladkém svalu patří do skupiny G_q receptorů, endotelin působením na tento receptor aktivuje signální kaskádu *PLC-DAG/IP₃-PKC* vedoucí k vasokonstrikci (Katzung 2018, Klabunde 2019b, Mladěnka 2018).

Endotelin působí nejen na cévy, ale také na srdce ovlivňováním krevního tlaku, a proto je na pomezí mezi celkovou a lokální regulací. Jeho poločas je velmi krátký a produkce přísně regulovaná. V ledvinách má endotelin vliv na vasokonstrikci a na snížení glomerulární filtrace, v plicích podporuje bronchokonstrikci (Katzung 2018, Štejfá et al. 2007).

3.4.1.1.1. Dysfunkce endotelu

Dojde-li k poruše vrstvy endotelu, nastanou změny i v plnění jeho základních funkcí, výsledkem tak může být až funkční systémová porucha. Dysfunkce spočívá především v převaze vasokonstrikčních působků a ve zvýšené vasokonstrikci, narušena je poté celkově i mechanická, metabolická i sekreční endotelová aktivita.

Endotel může být poškozený z mnoha různých příčin – mechanickými, chemickými, imunitními, infekčními či degenerativními vlivy. Při nesprávné činnosti endotelu je dále charakteristická jeho zvýšená permeabilita, prokoagulační aktivita související se vznikem trombů či schopnost aktivovat zánětlivé reakce. Tyto procesy hrají stěžejní úlohu v patofyziologické podstatě řady onemocnění oběhového systému – vysoký krevní tlak, srdeční selhání, kornatění tepen (ateroskleróza) (Erdman et al. 2007, Karásek a Vaverková 2009, Klener et al. 2012, Štejfa et al. 2007).

Poslední zmíněný patofyziologický proces je závažný, neboť rozvíjející se aterosklerotické změny postupně zužují průsvit tepny nadměrným ukládáním tuků v cévní stěně a rozrušují celkově výstelku endotelu, výsledkem může být usazování trombu na vytvořeném sklerotickém plátu až úplný uzávěr tepny. Riziko vzniku endotelové dysfunkce významně zvyšují obezita a diabetes (Čertík et al. 2005, Klabunde 2019b, Vlček et al. 2010, Vokurka 2018).

3.4.1.2. Myogenní regulace

Roztažení stěny cévy přes určitou mez vyvolané zvýšenou hodnotou krevního tlaku vede k odpovědi v podobě kontrakce hladkosvalové části cévní stěny. Nastane zmenšení celkového průsvitu cévy. Úlohou tohoto regulačního procesu je zachovat relativně stálý krevní tok cévou i za situace změny tlaku (Kittnar a Mlček 2009).

3.4.1.3. Enzymová regulace

Renin-angiotensin-aldosteronový systém (RAA/RAS)

Tento enzymový regulační systém je podstatný pro regulaci mnoha fyziologických funkcí – ovlivňuje hodnotu krevního tlaku, objem extracelulární tekutiny i endokrinní aktivitu srdce. Činnost tohoto systému je patrná v mozku, srdci, ledvinách, tukové tkáni, kosterním svalstvu, v samotných hladkosvalových buňkách cév i v neuronech nervové soustavy.

Renin se tvoří a následně uvolňuje z buněk juxtaglomerulárního aparátu ledvin jako reakce organismu na řadu podnětů, mezi něž patří nízký obsah NaCl v ledvinných tubulech, zvýšená aktivita sympatiku, činnost NO a prostanoidů jako vasodilatačních činitelů, nízké prokrvení ledvin a stimulace beta 1 receptorů v ledvinách (Lüllmann et al. 2004, Štejfa et al. 2007). Renin funguje jako katalyzátor přeměny neaktivní formy angiotensinogenu na angiotensin I (AT1) a ten je poté činností enzymu angiotensin konvertující enzym (ACE) v krevním oběhu (především v plicích) metabolizován na angiotensin II (AT2) (*viz Obr. 6*) (Junqueira et al. 1997, Katzung 2018, Miller a Arnold 2019, Rokyta et al. 2000, Shier et al. 2016).

AT2 navázáním na AT₁ receptor (G_q) působí vasokonstrikci, která se může projevit až zvýšením krevního tlaku, ovlivní také proliferaci buněk, uvolnění aldosteronu a vasopresinu, aktivaci sympatiku a dysfunkci baroreceptorů. Stimulace sympatického nervového systému je zajištěna aktivním presynaptickým uvolňováním noradrenalinu a inhibicí jeho zpětného vychytávání na zakončeních jednotlivých nervových vláken.

Degradací AT2 (především neutrální endopeptidázou) vzniká heptapeptid označovaný jako ANG (1-7) působící opačně než AT2, tedy snižuje krevní tlak a vaskulárními, kardiálními, renálními a nervovými mechanismy plní kardioprotektivní úlohu (Miller a Arnold 2019).

AT2 je hlavním stimulem pro uvolnění aldosteronu, steroidního hormonu produkovaného kůrou nadledvin. Stimulací mineralokortikoidních receptorů (MR) v distálním a sběracím kanálku ledvin aldosteronem dochází k zadržování sodíku, aktivaci receptorů na povrchu buňky vyvolávajících vasokonstrikci a výsledným efektem je tedy opět zvýšení krevního tlaku (Junqueira et al. 1997, Miller a Arnold 2019, Rokyta et al. 2000, Trojan et al. 2003).

Jelikož všechny tři humorální působky tohoto regulačního mechanismu vykazují vasokonstrikční aktivitu, bývá právě inhibice míst jejich působení podstatou farmakoterapie řady onemocnění spojených s kardiovaskulárním systémem. Například skupina ACE inhibitorů, antagonistů receptorů pro AT2 nebo blokátory receptorů pro aldosteron patří mezi významná antihypertenziva (Doležal et al. 2022, Keith Wan Kee 2013, Klener et al. 2012, Souček et al. 2019, Vítovec et al. 2017). Za zmínku stojí, že AT receptory se nacházejí i na endotelu a zde pravděpodobně mohou

a IP₃ a následnou aktivací PKC. Zvýšená hladina vápníku následně aktivuje fosfolipázu A₂ (PLA₂) a endoteliální NO-syntázu (eNOS) (Biel et al. 2018, Katzung 2018, Mladěnka 2018). Kromě toho mohou být B2R spojeny i s G_i proteinem. Působení bradykininu na B2 receptory je podobné jako působení histaminu na jeho H2 receptory, histamin hraje stejně jako bradykinin úlohu při dráždění volných nervových zakončení zodpovědných za vedení bolesti (Štejfa et al. 2007, Vokurka 2018).

Kininy působí vasodilatačně také na arterioly ledvin, čímž ovlivňují proces glomerulární filtrace (Trojan et al. 2003). Jejich efekt spočívající ve stimulaci prokrvení je patrný také ve žlázách gastrointestinálního traktu a potních žlázách kůže (Kittnar et al. 2009).

Kininy jsou rychle metabolizovány pomocí nescifických exopeptidáz a endopeptidáz (kinináz). Kinináza I je syntetizována v játrech, kinináza II se nachází v plazmě a endotelových buňkách cév a působí také jako angiotensin konvertující enzym (Katzung 2018).

3.4.2. Centrální regulace

Mechanismy regulace centrální vycházející z centra v mozkovém kmeni zodpovídají především za udržení stálého toku krve v cévách řízením periferního odporu a srdečního výdeje (Langmeier et al. 2009, Petřek 2019, Trojan et al. 2003).

3.4.2.1. Hormonálně-neurogení regulace

Cirkulace krve je na centrální úrovni regulována pomocí vegetativního nervového systému (VNS – neurogení složka regulace) a činností některých hormonů (hormonální složka regulace) (Štejfa et al. 2007, Trojan et al. 2003).

Z funkčního pohledu dělíme nervový systém na vegetativní a somatickou část. Vegetativní (autonomní) část je tvořena protichůdně působícími celky – sympatickým a parasympatickým. Vegetativní systém inervuje hladké svalstvo různých orgánů – cév, žláz, srdce a tukové tkáně; tím se tedy podílí nejen na udržení stálosti vnitřního

prostředí, ale také přizpůsobuje tkáňovou a orgánovou aktivitu konkrétním požadavkům (Langmeier et al. 2009, Lüllmann et al. 2004, Shier et al. 2016, Trojan et al. 2003, Vajner et al. 2017). Výraz autonomní často překládaný jako „*samostatný, nezávislý*“ je označením velmi nepřesným, protože regulace činnosti je zajištěna jak na centrální úrovni (mozkem a míchou), tak pomocí mechanismů periferních (nervovými vlákny) a srdce má i určitý stupeň automacie (Dylevský 2019).

Sympatická a parasympatická část systému se liší typem mediátoru vedoucího vzruch ze zakončení neuronu směrem k příslušnému efektoru. V případě sympatického vegetativního systému je hlavním mediátorem působícím na adrenergní receptory noradrenalin (NA), u parasympatiku je molekulou vazající se na cholinergní typ receptorů acetylcholin (Ach) (Katzung 2018, Langmeier et al. 2009, Petřek 2019, Vajner et al. 2017).

Většinu útrobních orgánů regulují oba tyto typy nervového systému, přičemž při stresu, chorobě a zátěžové situaci převládá aktivita sympatiku, na druhou stranu činnost parasympatiku je typická zejména při trávení, vstřebávání, spánku a při jiných klidových situacích (Trojan et al. 2003).

Hormony můžou na svou cílovou strukturu působit dvěma způsoby, mezi něž řadíme mechanismus druhého posla a mechanismus jaderný přes receptor v cytosolu buňky.

První zmíněný mechanismus spočívá nejprve v navázání hormonu jako prvního posla na příslušný receptor, čímž dojde následně k aktivaci malé signální molekuly – tzv. druhého posla. Tím bývá nejčastěji již několikrát zmíněný cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), vápenaté kationty (Ca^{2+}), diacylglycerol (DAG), inositoltrifosfát (IP_3) a řada dalších, význam sekundárního posla tkví především ve zprostředkování účinku působícího hormonu (Ledvina et al. 2009a, Mourek 2012).

Katecholaminy

Z této skupiny látek označovaných jako deriváty aminokyseliny tyrozinu je významný především hormon adrenalin (A) vznikající v dřeni nadledvin a dále neurotransmitter noradrenalin (NA) uvolňovaný z buněk nervovým impulzem. Vylučování těchto

hormonů je řízeno činností sympatiku a může být ovlivněno řadou podnětů – např. zátěž pro organismus, trauma, poplachová situace apod (Katzung 2018, Rokyta et al. 2000, Trojan et al. 2003, Vajner et al. 2017).

Rozlišujeme dva základní typy adrenergických receptorů – alfa a beta včetně příslušných podtypů; efekty v hladkém cévním svalstvu po receptorové stimulaci mohou být různé, jelikož vždy velmi záleží, který konkrétní typ receptoru bude katecholaminem aktivován. Adrenalin je typický afinitou k oběma typům těchto receptorů, noradrenalinem jsou v běžných dávkách aktivovány pouze alfa receptory (Langmeier et al. 2009, Štejfa et al. 2007, Trojan et al. 2003). Typy a podtypy adrenergických receptorů, včetně jejich výskytu a výsledného efektu v případě jejich stimulace jsou podrobněji rozepsány v *Tab. 1*.

Alfa₁ typ receptoru je pro oběhový systém typický, a to zejména v odporových cévách. Tento podtyp patří do skupiny G_q receptorů, navázáním katecholaminu dojde k aktivování kaskády *PLC-DAG/IP₃-PKC* vedoucí k vasokonstrukci (Gao 2017, Katzung 2018, Lüllmann et al. 2004, Mladěnka 2018, Trojan et al. 2003).

Rovněž receptory typu beta mají své příslušné podtypy. Cévy jsou charakteristické výskytem beta₂ receptorů, zatímco podtyp beta₁ je typický zejména pro srdce. Receptory v cévách řadíme do skupiny G_s receptorů a jejich stimulací nastává opačný děj (vasodilatační) v porovnání s receptory alfa (Katzung 2018, Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000, Trojan et al. 2003).

TYP RECEPTORU	VÝSKYT	VÝSLEDNÝ DĚJ NAVÁZÁNÍM MEDIÁTORU
alfa 1	hladké svalstvo	tvorba IP ₃ a DAG, uvolnění Ca ²⁺ , vasokonstrikce
alfa 2	presynaptická nervová zakončení, krevní destičky, tuková tkáň, hladké svalstvo	inhibice adenylátcyklázy (AC), snížení cAMP
beta 1	srdce, tuková tkáň, mozek, ledvinné tubuly	stimulace adenylátcyklázy (AC), zvýšení cAMP, vasodilatace
beta 2	hladké svalstvo, srdeční svalstvo	stimulace adenylátcyklázy (AC), zvýšení cAMP, vasodilatace
beta 3	tuková tkáň, srdce	stimulace adenylátcyklázy (AC), zvýšení cAMP, vasodilatace

Tabulka 1 - Adrenergní receptory – typy, výskyt, výsledek aktivace

Převzato a upraveno z: Katzung (2018)

Výsledkem vazby noradrenalinu na receptory α_1 je vasokonstrikce (Langmeier et al. 2009, Rokyta et al. 2000). V porovnání s adrenalinem v případě tohoto působku chybí systémový efekt, jelikož noradrenalinem je většinou ovlivňována pouze konkrétní ohraničená oblast (Lüllmann et al. 2004).

Acetylcholin

Syntéza tohoto mediátoru vychází z cholinu a acetylkoenzymu A, účinek je zprostředkován pomocí cholinergních receptorů (Kachlík 2018, Lüllmann et al. 2004, Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000).

Cholinergní receptory se dělí do dvou kategorií – skupina nikotinových receptorů (N – součástí iontového kanálu) a muskarinových (M – vázané s G proteinem). U muskarinového receptoru je rozlišováno 5 podtypů a výsledný účinek po navázání agonisty není vždy stejný – působí excitačně i inhibičně. V cévách se vyskytují zejména M_3 receptory, jejich stimulace vede ke kontrakci hladké svaloviny, naopak v endotelu navodí vasodilataci prostřednictvím stimulace tvorby NO. V srdci je charakteristická přítomnost M_2 typu a jejich efekt je inhibiční. Typy muskarinových receptorů, jejich výskyt a výsledek stimulace jsou uvedeny podrobněji v *Tab. 2* (Kittnar et al. 2021, Mladěnka 2018, Nováková 2011, Trojan et al. 2003).

TYP RECEPTORU	VÝSKYT	VÝSLEDNÝ DĚJ NAVÁZÁNÍM MEDIÁTORU
M1	CNS neurony, postgangliová vlákna sympatiku	tvorba IP3 a DAG, uvolnění Ca^{2+} , vasokonstrikce
M2	srdce, hladké svalstvo, CNS neurony	otevření draselných kanálů, <i>inhibice</i> adenylátcyklázy (AC)
M3	exokrinní žlázy, cévy (endotel i hladké svalstvo), CNS neurony	tvorba IP3 a DAG, uvolnění Ca^{2+} , kontrakce hladkého svalu, relaxace endotelu
M4	CNS neurony	otevření draselných kanálů, <i>inhibice</i> adenylátcyklázy (AC)
M5	cévní endotel (hlavně v mozku), CNS neurony	tvorba IP3 a DAG, uvolnění Ca^{2+} , vasokonstrikce

Tabulka 2 - Muskarinové receptory – typy, výskyt, výsledek aktivace

Převzato a upraveno z: Gao (2017), Katzung (2018)

Nikotinový receptor je tvořen čtyřmi podjednotkami a jeho otevřením zprostředkovaným vazbou acetylcholinu je spuštěn přestup zejména sodných kationtů (z části i vápenatých kationtů), čímž nastává depolarizace (Kittnar et al. 2021, Martínková et al. 2007, Mladěnka 2018, Trojan et al. 2003).

Acetylcholin zprostředkovává přenos vzruchů na mnoha místech: na postgangliových vlákních parasymptiku, v gangliích, nadledvinkách a na nervosvalové ploténce (Petřek 2019). V neposlední řadě se uplatní v CNS.

Serotonin (5-HT = 5-hydroxytryptamin)

Serotonin plní úlohu neurotransmiteru, lokálního hormonu gastrointestinálního traktu a důležitý je také v procesu srážení krve (Katzung 2018, Lüllmann et al. 2004). Zodpovídá za řadu fyziologických funkcí organismu, např. kontrakce hladkého svalstva a stimulace peristaltiky v GIT a důležitá je také jeho úloha v centrálním nervovém systému, kde reguluje spánek, náladu, vedení bolesti, vědomí, sexuální chování, navozuje nauzeu a zvracení (Martínková et al. 2007, Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000, Trojan et al. 2003). Jeho vasoaktivita je dána typem receptoru, který se v cévě nachází, výsledný efekt může být vasodilatační i vasokonstrikční. Je popsáno sedm typů serotoninových receptorů, v cévách hraje roli podtyp 5-HT₂, méně důležité jsou typy 5-HT₁ a 5-HT₇. 5-HT₂ receptor (G_q skupina) se nachází ve velkých artériích elastického typu a jeho stimulací nízkými koncentracemi serotoninu za fyziologických podmínek nastává vasodilatace prostřednictvím endotelových buněk, naopak především za patologických situací serotonin vyvolá vasokonstrikci přímým účinkem na hladký sval. Receptory 5-HT₇ se nacházejí v odporových arteriích, jsou typu G_s a jejich aktivace přispívá k vasodilataci. Receptory 5-HT₁ (G_i) se nacházejí v cévách CNS a jsou místem účinku triptanů. Serotonin je shromažďován a ukládán také v denzních tělískách trombocytů a zde podporuje hemostázu shlukováním destiček (Junqueira et al. 1997, Mladěnka 2018, Rokyta et al. 2000).

Vasopresin

Vasopresin jinak též označovaný jako antidiuretický hormon (ADH) neboli adiuretin je produkován hypothalamem a odtud transportován do oblasti zadního laloku hypofýzy (Čihák 2016, Silbernagl a Lang 2001). Známé jsou jeho receptory typu V_{1a} , V_{1b} a V_2 (Trojan et al. 2003).

Stimulace V_{1a} receptoru v cévách je spojená s vyvoláním vasokonstrikce (Mladěnka 2018).

Receptory V_2 ovlivňují cévy nepřímo: stimulace V_2 receptorů (G_s) zvyšuje zpětnou resorpci vody, tím působí proti tvorbě moči (diuréze) a podporuje zadržování vody v těle. Zvýšením reabsorpce vody v ledvinách dojde ke zvýšení napětí cévní stěny a tím i ke zvýšení krevního tlaku a nastává tedy vasokonstrikční (presorický) efekt (Kachlík 2018, Rokyta et al. 2000, Trojan et al. 2003).

Natriuretické peptidy

Tyto hormony jsou produkovány některými buňkami srdeční svaloviny – patří sem atriový (atriální) natriuretický peptid (ANP) vznikající v síních při natažení buněk a B-natriuretický peptid (BNP) tvořený především v srdečních komorách. Ke zvýšení jejich koncentrace v krvi dochází při zvýšení krevního tlaku a vzestupu objemu extracelulární tekutiny (Čihák 2016, Langmeier et al. 2009). Působením ANP a BNP na ledvinné cévy a kanálky dojde ke zvýšenému vylučování moči, sodných kationtů a méně draselných kationtů, čímž dochází ke zmenšení objemu mimobuněčné tekutiny (Čihák 2016, Štejfa et al. 2007).

Dalším typem je C-natriuretický peptid (CNP) syntetizovaný primárně v centrálním nervovém systému, kde vykazuje vasodilatační aktivitu (Katzung 2018). CNP také vzniká periferně přímo v endotelu a působí na sousední hladký cévní sval. Aktivací guanylátcyklázy pGC a následným zvýšením hladiny cGMP jako sekundárního posla nastává vasodilatační efekt (Mladěnka 2018). Vyšší koncentrace tohoto peptidu je v organismu typická při ledvinném selhání (Štejfa et al. 2007).

3.5. Role iontových kanálů

IONT	KONCENTRACE	
	INTRACELULÁRNÍ (mmol/l)	EXTRACELULÁRNÍ (mmol/l)
Na ⁺	12	135-145
K ⁺	155	4
Ca ²⁺	10 ⁻⁸ - 10 ⁻⁷	2

Tabulka 3 - Koncentrace nejdůležitějších iontů pro vasokonstrikci a vasodilataci v intracelulárním a extracelulárním prostředí

Převzato a upraveno z: Nachtigal (2020)

Ve vaskulární fyziologii hraje velkou roli membránový potenciál, který je určený koncentrací především draselných a sodných iontů na obou stranách buněčné membrány. Třetím důležitým typem iontů jsou vápenaté, které se přímo podílejí na svalovém stahu.

Koncentrace těchto iontů v cytoplazmě buňky hladkého cévního svalu a ve vnějším prostředí buňky jsou uvedeny v *Tab. 3*. Ionty přecházejí přes membrány pomocí iontových kanálů, ATPáz a výměníků. Jejich přehled je uveden v následujícím textu.

Kanály řízené ryanodinovými receptory (RyR)

Tyto iontové kanály se nacházejí na povrchu sarkoplazmatického retikula buněk a zprostředkovávají především uvolnění vápenatých kationtů ze sarkoplazmatického retikula do cytoplazmy. Celkem můžeme rozlišit 3 podtypy, pro srdeční sval a hladký cévní sval je typický výskyt zejména RyR2 typu (Song et al. 2016, Tykocki et al. 2017).

RyR kanály jsou regulovány cytosolickou hladinou vápníku (vázaného na kalmodulin) – velmi nízká hladina $< \sim 100$ nM je uzavírá, nízká hladina vápníku (~ 10 μ M) vede

k aktivaci a vysoká koncentrace (mikromolární) je opět inhibuje. K aktivaci kanálu stačí zvýšení hladiny vápníku v nejbližším okolí kanálu, což způsobí zesílení vápníkového signálu a přispívá k vasokonstrikci (Tykocki et al. 2017).

Kanály řízené inositol-1,4,5-trifosfátovými receptory (IP₃R)

Tento typ iontových kanálů opět najdeme na povrchu sarkoplazmatického retikula. Jak již napovídá jejich pojmenování, tyto kanály jsou aktivovány zejména činností sekundárního posla IP₃ a důsledkem je zvýšený efflux vápníku do cytoplazmy. Aktivita receptorů je regulována zejména pomocí agonistů G_q receptorů a také okolní koncentrací Ca²⁺ iontů (analogicky jako u RyR kanálů). Na regulaci se podílejí i cAMP, Mg²⁺ ionty a různé proteinkinázy (Brozovich et al. 2016, Gao 2017, Katzung 2018, Levitan a Dopico 2016, Taylor et al. 2014, Tykocki et al. 2017).

TRP kanály

Z anglické zkratky lze tento typ receptorů označit jako receptorové kanály přechodného potenciálu (*transient potential*). U těchto kanálů rozlišujeme šest hlavních podtypů – C, M, V, A, P, ML (Tykocki et al. 2017).

Aktivita těchto kanálů je ovlivňována řadou různých podnětů – intracelulárními signalizačními drahami, fyzikálními stimuly (teplota) či mechanickým stresem, přičemž ke stimulaci kanálů dochází zejména cestou *G_q receptor-PLC-DAG/IP₃-PKC*. Otevřením je umožněn vstup extracelulárních vápenatých kationtů do buňky i jejich uvolnění ze zásobních organel buňky, čímž je podpořena vasokonstrikce (Blair et al. 2022). Menší část těchto kanálů je propustná pro sodné kationty a podílí se na depolarizaci buněčné membrány.

Napětově řízené vápenaté kanály (Ca_v – VGCC)

Tento typ iontových kanálů je jedním z hlavních způsobů, jakými vstupuje extracelulární vápník dovnitř buňky. Při membránové depolarizaci (vtok sodných

a vápenatých iontů) dojde k otevření těchto kanálů a následnému influxu vápenatých kationtů do buněk hladkého svalstva, což je stěžejní předpoklad pro svalovou kontrakci (Dopico et al. 2018, Spencer a Crozier 2012). Základními skupinami kanálů jsou typy L, N, P/Q, T.

- L-typ (*long* = dlouhé) – hladký sval, srdeční sval
- N-typ (neuronové) – mozek, periferní nervový systém
- P/Q typ – Purkyňovy buňky v mozečku
- T-typ (*transient* = přechodné) – neurony, hladký sval

V hladkém svalstvu jsou klíčové typy L a T. Vysokoprahové (aktivované velkou potenciálovou změnou) kanály L typu můžeme podle strukturní podjednotky rozdělit do čtyř podskupin označovaných jako Ca_v 1.1 až 1.4. Dihydropyridiny (dipiny) jsou sloučeniny používané jako inhibitory těchto kanálů, tedy jako významná vasodilatancia, zatímco látka BayK-8644 funguje jako agonista (Doležal 2022, Tykocki et al. 2017, Zamponi et al. 2015). Jak již bylo zmíněno výše, otevírání a uzavírání těchto membránových kanálů se odvíjí od membránového potenciálu.

Vasokonstrikční látky agonisticky působí na receptory spojené s G_q proteinem a kaskádou *PLC-DAG-PKC* zodpovídají za depolarizaci a otevření vápenatých kanálů (Gurney a Clapp 1994, Rokyta et al. 2000, Veizerová et al. 2007).

Naopak uzavření těchto kanálů za re/hyperpolarizaci a tím vasodilatace je zprostředkováno signalizační kaskádou *G_s-AC-cAMP-PKA*.

Draselné kanály

Tuto skupinu kanálů tvoří několik různých typů – napětově řízené draselné kanály (K_v), draselné kanály aktivované vápníkem (K_{Ca}), draselné kanály řízené ATP (K_{ATP}) a draselné kanály usměrněné dovnitř (K_{ir}) (Gao 2017, Tykocki et al. 2017).

Draselné kationty jsou pro vytváření potenciálu buněčné membrány zásadní, jelikož pro tento iont je membrána buněk propustná nejvíce (Nachtigal 2020).

Napětově řízené draselné kanály (K_v)

Tyto kanály mají za úkol udržovat klidový potenciál buněčné membrány. K jejich aktivaci dojde při membránové depolarizaci (Trojan et al. 2003, Tykocki et al. 2017).

Kanály, které nemají schopnost se inaktivovat, jsou při klidovém membránovém potenciálu uzavřeny a draselné ionty z buňky neunikají. Při depolarizaci buňky dochází k otevření kanálů, za vysoké hodnoty depolarizace, kdy se vnitřní membrána stává pozitivnější, jsou kanály otevřeny prakticky stále a draselné ionty buňku opouštějí. V této chvíli dojde k inaktivaci sodíkových kanálů. Únik draselných kationtů z buňky umožní výrazný pokles kladného náboje způsobeného depolarizací a nastane buněčná repolarizace – návrat ke klidovému (více negativnímu) membránovému potenciálu (Rokyta et al. 2000, Trojan et al. 2003).

Blokáda K_v kanálu vlivem agonistů působících na G_q receptory vyvolá vasokonstriktici. K inhibici kanálu dochází pomocí proteinkináz (zejména PKC) a zvýšením nitrobuněčné koncentrace vápenatých kationtů.

Vasodilatancia agonisticky působící na G_s receptory stimuluje cestu *AC-cAMP-PKA* nebo *sGC-cGMP-PKG*, čímž aktivují draselné K_v kanály a způsobí vasodilataci (Dopico et al. 2018, Tykocki et al. 2017).

Vápníkem aktivované draselné kanály (K_{Ca})

Tento typ kanálu je aktivován zvýšením nitrobuněčné koncentrace vápenatých kationtů (Rokyta et al. 2000).

Dělíme je do 3 skupiny – velké vodivostní kanály (BK_{Ca}), kanály s vodivostí střední (IK_{Ca}) a malou (SK_{Ca}). Kanály BK_{Ca} jsou typické pro hladký cévní sval, ostatní se nacházejí hlavně na endotelu.

V případě otevření všech podtypů těchto kanálů dochází k effluxu draselných kationtů z buňky, který je velmi důležitý pro vaskulární fyziologii, protože ovlivní nejbližší buňky. Typicky K^+ ionty uvolněné z endotelu regulují membránový potenciál sousední svalové buňky (Levitan a Dopico 2016, Tykocki et al. 2017). K blokádě BK_{Ca} kanálu jsem v této práci použila iberiotoxin.

Draselné kanály řízené ATP (K_{ATP})

Aktivita těchto kanálů závisí na koncentraci intracelulárního ATP – při sníženém množství ATP v buňce dojde k aktivaci kanálu a nastane vasodilatace, naopak kanál je uzavřený v případě, že je koncentrace ATP v buňce dostatečně vysoká (Hibino et al. 2010, Tykocki et al. 2017). Inhibice těchto kanálů vyvolá vasokonstrikci. Tyto kanály jsou aktivní při stavech hypoxie, acidózy, endotoxického šoku, při poklesu hladiny intracelulárního ATP.

K inhibici se v experimentálních pokusech používá sloučenina glibenklamid (derivát sulfonylurey vážící se na strukturální podjednotku kanálu).

Draselné kanály usměrněné dovnitř (K_{ir})

Zejména malé artérie jsou charakteristické přítomností tohoto typu iontových kanálů. Díky jejich činnosti je při hyperpolarizaci membrány (negativní membránový potenciál oproti rovnovážnému potenciálu pro K^+ ionty) umožněn vstup draselných kationtů do buňky, zatímco při mírné membránové hyperpolarizaci naopak nastává mírný efflux těchto iontů a za depolarizace jsou uzavřené. Za specifických podmínek tak zajišťují atypický pohyb draselných kationtů směrem do buňky (označení *usměrněné dovnitř*) (Hibino et al. 2010). Jejich význam tedy spočívá v udržení negativní polarity membrány, a tedy ve vasodilataci zejména v mikrocirkulaci. Aktivace může být zajištěna vazbou agonistů na G_s receptor-AC-cAMP-PKA.

Jejich inhibice např. agonisty cestou G_q -PLC-DAG/IP₃-PKC naopak vede k vasokonstrikci.

Souhra iontových kanálů

Při klidovém membránovém potenciálu hladkého cévního svalu jsou napětově řízené vápenaté i draselné kanály uzavřeny.

Uzavřené napětově řízené vápenaté kanály neumožňují výrazný vstup extracelulárních vápenatých kationtů do buňky. Hladina vápníku v buňce je regulována také effluxem těchto kationtů z buňky činností Na^+/Ca^{2+} výměníku

a plazmatické ATPázy PMCA – a dále i činností nitrobuněčné ATPázy SERCA, která přesouvá Ca^{2+} ionty do sarkoplazmatického retikula (Bosnjak 1993, Cheng et al. 2019, Knox et al. 2019). Zvýšení hladiny vápníku v buňce je nutné pro zahájení vasokonstrikce.

Vasokonstrikce nastává jako důsledek depolarizace buněčné membrány za současného nárůstu koncentrace vápníku v buňce. Depolarizací se otevírají napětově řízené vápenaté kanály s influxem vápenatých kationtů. Vstup vápníku probíhá také prostřednictvím TRP kanálů (Dixon et al. 2022). Na vzestupu nitrobuněčné koncentrace vápenatých kationtů se podílí i uvolnění vápníku ze zásob buňky aktivací ryanodinových a IP_3 receptorů. Draselné kanály jsou v první fázi depolarizace uzavřeny. Nárůst intracelulární koncentrace vápenatých kationtů v buňce a membránová depolarizace následně aktivují BK_{Ca} a K_v kanály, nastává efflux draselných kationtů. Rozdíl membránových potenciálů se opět zvýší (repolarizace až hyperpolarizace), klesne cytoplazmatická hladina vápenatých iontů a je ukončena vasokonstrikce (Ko EA et al. 2008).

Zvláštní postavení mají kanály K_{ir} a K_{ATP} . Podílejí se jak na hyperpolarizaci buněčné membrány, tak na udržení klidového membránového potenciálu, a to zejména v mikrocirkulaci (Dixon et al. 2022).

3.6. Choroby kardiovaskulárního systému

Ischemická choroba srdeční (ICHS)

Příčinou rozvoje tohoto onemocnění jsou zejména změny základní cévní struktury koronárních věnčitých tepen srdce způsobené procesem aterosklerózy (*viz kapitola 3.4.1.1.1.*). Dysbalance dějů *dodávka-spotřeba* kyslíku v určité části srdce je výrazným a nebezpečným důsledkem těchto změn (Souček et al. 2019).

Mezi formy akutní ICHS řadíme nestabilní anginu pectoris (AP), akutní infarkt myokardu (IM) a náhlou srdeční smrt. Chronickou (stabilizovanou) formou je němá ischemie myokardu bez jakýchkoli projevů a angina pectoris typická výskytem tzv. stenokardií (bolest a tlak na hrudi) (Klener et al. 2012).

Arteriální hypertenze

Vysoký krevní tlak je nejčastěji se vyskytující chronickou nemocí kardiovaskulární soustavy s vysokou prevalencí (Doležal et al. 2022, Lukáš a Žák 2010). Není to pouze samostatná nosologická jednotka, ale také významný rizikový faktor výše zmíněných ischemických stavů, podobně nebezpečné je rovněž narušení funkčnosti ostatních orgánových systémů organismu. Toto onemocnění je charakteristické vasokonstrikcí a zvýšením periferního cévního odporu (Klener et al. 2012, Levitan a Dopico 2016, Souček et al. 2019, Vlček et al. 2010).

Srdeční selhání

Hypertenzí i ischemickými stavy může být způsoben další patologický proces – srdeční selhání. V tomto případě dochází k nedostatečnému zásobení tkáňových a orgánových struktur krví a základní funkce srdce jako tlakového čerpadla je narušena (Klener et al. 2012, Vokurka 2018).

3.6.1. Rizikové faktory

Predispoziční faktory jednotlivých chorob dělíme do dvou skupin podle toho, zda je můžeme či nemůžeme mít pod svou kontrolou. Faktory, které ovlivnit nemůžeme, jsou věk, genetické predispozice a pohlaví. Naopak existuje i řada faktorů, nad kterými jsme schopni udržovat kontrolu – jsou jimi správně léčené komorbidní stavy – diabetes, obezita mnohdy související zároveň s vysokou hladinou celkového cholesterolu, onemocnění jater, ledvin nebo štítné žlázy; dále zdravý styl života zahrnující přiměřenou pohybovou aktivitu, eliminace nebo omezení kouření, stresu a nadměrné konzumace alkoholu a v neposlední řadě sem patří stravovací návyky (Silbernagl a Lang 2001, Souček et al. 2019, Štejfá et al. 2007, Vlček et al. 2010). Dostatečný příjem flavonoidů potravou řadíme mezi kardioprotektivní faktory.

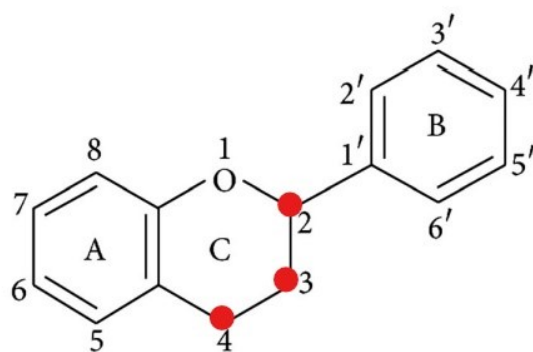
3.7. Flavonoidy

Flavonoidy jsou přírodní polyfenolické sloučeniny obsažené v ovoci a zelenině, jimž dávají typickou vůni a také barvu listů a květů. Dalším zdrojem mohou být také ořechy, semínka, čaj i káva. Strukturně se jejich molekula skládá ze dvou benzenových kruhů. Ty mohou být vzájemně propojeny pomocí heterocyklického pyranového kruhu (Abbas et al. 2017, Andersen a Markham 2006, Gross 2004). Jejich syntéza probíhá v rostlinách z aminokyseliny fenylalaninu, ta je přes fenylpropanol postupně přeměněna na 4-kumaroyl koenzym A, dalšími kroky dojde působením enzymu chalkon-syntázy ke vzniku základní patnáctiuhlíkaté kostry chalkonu jako prekurzoru řady flavonoidů (Ferreira et al. 2012). Základní struktura je na *Obr. 7*.

V závislosti na tom, který enzym (isomerázy, reduktázy, hydroxylázy a řada dalších) dále působí na základní strukturu chalkonu, bývají rozlišovány dvě třídy flavonoidů – první vycházející ze struktury 3-fenylchromanu (skupina isoflavonoidů) a druhá odvozená od 2-fenylchromanového základu (zástupci flavonů, flavonolů, flavanonů, flavan-3-olů, anthokyanidů) – viz *Tab. 4*. Isoflavonoidy obsažené typicky v sóje jsou strukturně podobné lidskému hormonu estrogenu – konkrétními zástupci jsou daidzein a genistein.

Rozdíl ve struktuře jednotlivých látek spočívá nejen v různém stupni oxidace pyranu, ale také ve stupni polymerace, celkovém množství substituentů a jejich umístění na kruzích. Na základní strukturu bývá dále většinou napojen cukr, případně organická kyselina (Agrawal 2011, Feng et al. 2018, Harborne 1994, Spilková et al. 2016).

Glykosidická forma je mezi zástupci častější, glykosidické molekuly jsou hydrofilního charakteru, což znamená, že pro absorpci je potřeba tyto molekuly nejdříve štěpit pomocí střevních hydroláz. Jinak je tomu u flavonoidů v podobě aglykonu, kdy je absorpce snazší, zprostředkovaná pasivním transportem (Ciumărnean 2020, Kawabata et al. 2019).



Obrázek 7 - Základní struktura flavonoidů (s vyznačením kruhů A-C a očíslovanými pozicemi)

Převzato a upraveno z: Jucá et al. (2020)

SKUPINA FLAVONOIDŮ	CHEMICKÁ STRUKTURA	ZÁSTUPCI
FLAVONY		apigenin, luteolin, diosmetin
FLAVONOLY		rutin, kvercetin, kempferol, myricetin
FLAVANONY		naringenin, hesperidin
FLAVAN-3-OLY		katechin, epikatechin, epigalokatechin
ISOFLAVONOIDY		genistein, daidzein, biochanin A

Tabulka 4 - Typy flavonoidů – chemické struktury a přehled zástupců

Převzato a upraveno z: Abbas et al. (2017), Spilková et al. (2016)

3.7.1. Farmakologické účinky flavonoidů

Flavonoidy přijímané potravou v dávce ~200 mg/den významně snižují celkovou mortalitu (bez specifikace příčiny) (Liu 2017). Navozují řadu příznivých účinků včetně vasodilatačních a antihypertenzních, působí protektivně vůči endoteliální dysfunkci a vykazují antioxidační i hypolipidemický efekt (Yung et al. 2008).

Vasodilatační a antihypertenzní účinek

Řada studií prokázala schopnost flavonoidů relaxovat cévy *ex vivo* a snižovat krevní tlak *in vivo* (Pourová et al. 2018). Mechanismus účinku se u jednotlivých zástupců může významně lišit. U některých zástupců flavonoidů je vasodilatace ovlivněna přítomností endotelu (Quiñones et al. 2013). Flavony (konkrétně luteolin) mají vasodilatační účinek zprostředkovaný aktivací endoteliální *cAMP/PKA* kaskády, která vyvolá aktivaci NO syntázy (eNOS). Výsledkem je zvýšená tvorba vasodilatačního NO a jeho difuze k sousednímu hladkému svalu (Abbas et al. 2017, Ciomărnean 2020, Maaliki et al. 2019, Oak et al. 2018). V případě vasodilatačního účinku prostřednictvím cévního endotelu je možná celá řada dalších mechanismů – inhibice tvorby vasokonstričních faktorů (např. endotelin 1), zvýšení tvorby vasodilatačních faktorů (např. prostacyklin) nebo antagonistické působení na muskarinových receptorech na endoteliální membráně. Vasodilatační mechanismus flavonoidů může spočívat také v inhibici PKC v hladkém cévním svalu či v inhibici zpětného vychytávání endoteliálního vápníku (Herrera et al. 1996, Pérez-Vizcaíno et al. 2002). Látky epikatechin a myricetin vykazují inhibiční aktivitu vůči vasokonstričním působkům (endotelin 1 a angiotensin II) (Rana a Gulliya 2019, Šumpelová 2017). V případě epikatechinu bylo prokázáno, že jeho účinek závislý na přítomnosti endotelu je pravděpodobně spojen se zvýšením intracelulární koncentrace vápenatých kationtů, která je následně důležitá pro aktivaci eNOS (Yung et al. 2008).

Naproti tomu kvercetin, isorhamnetin a tamarixetin navozují vasodilataci přímým účinkem na hladký cévní sval (zjištěno v pokusech *ex vivo* na izolované potkaní aortě), přesný mechanismus zatím není objasněn, mohl by zahrnovat ovlivňování proteinkináz (např. inhibici PKC) (Larson et al. 2012, Najmanová et al. 2016).

Genistein jako zástupce isoflavonoidů snižuje krevní tlak prostřednictvím inhibice tyrosinkinázy Pyk2, která mimo jiné reguluje aktivitu vápníkových kanálů (Ciumărnean 2020, Maaliki et al. 2019). Kempferol signální drahou *cAMP/PKA* aktivuje kanály BK_{Ca} , což urychluje membránovou hyperpolarizaci a vede k vasodilataci (Yamagata et al. 2015).

Další možnost farmakologického účinku představuje ovlivnění mechanismů, které regulují vaskulární systém. Kempferol a kvercetin, oba ze skupiny flavonolů, modulují aktivitu RAS systému, zlepšují činnost endotelu a regulují kontrakci hladkého svalstva cév (Ciumărnean 2020, Feng et al. 2018, Larson et al. 2012). Delphinidin, zástupce anthokyanidinů, inhibuje vasokonstriční aktivitu angiotensin konvertujícího enzymu, ale koncentrace potřebná k dosažení tohoto efektu je jen stěží dosažitelná *in vivo* (Goszcz et al. 2017). Flavanoly snižují krevní tlak inhibicí angiotensin konvertujícího enzymu a ovlivněním produkce NO (Quiñones et al. 2013, Watson et al. 2018).

Flavonoidy mohou mít i další účinky spojené s cévním systémem. Na celkovém snížení kardiovaskulárního rizika má významný vliv schopnost flavonoidů snižovat arteriální ztuhlost (Spencer a Crozier 2012, Ullah et al. 2020). Genistein redukuje hypertrofii hladkého svalstva v plicních tepnách a tím se podílí na snížení plicní hypertenze (Ciumărnean 2020).

Další účinky flavonoidů shrnuje následující *Tab. 5*:

ÚČINEK	MECHANISMUS
antitrombotický	inhibice nadměrné adhezivity krevních destiček, antagonistické působení vůči tromboxanu A ₂ (Ciumărnean 2020, Gross 2004)
antioxidační, antikarcinogenní	snížování množství reaktivních forem kyslíku (ROS), protektivní působení na antioxidační mechanismy (Jucá et al. 2020, Spilková a kol. 2016)
protizánětlivý	inhibice enzymů (COX, 5-LOX, fosfodiesterázy) = inhibice tvorby zánětlivých působků (Agrawal 2011, Ciumărnean 2020)
protialergický	inhibice syntézy leukotrienů, snížení vylučování histaminu (Ciumărnean 2020)
antiaterogenní	snížení oxidace LDL cholesterolu a celkové plazmatické hladiny tuků (Agrawal 2011, Ciumărnean 2020, Erdman et al. 2007, Gross 2004)

Tabulka 5 - Další účinky flavonoidů

3.7.2. Metabolismus flavonoidů

Pro objasnění mechanismu účinku flavonoidů přijímaných dietou je klíčové znát faktory určující uvolňování flavonoidů z potravy, míru absorpce a jejich osud v organismu (Hollman 2004). Flavonoidy jsou přijímány s potravou většinou v glykosidické formě. Biodostupnost parentních látek je velmi nízká, což omezuje biologickou aktivitu *in vivo* (Murota et al. 2018). Aglykony jsou oproti glykosidickým formám více lipofilní a výsledkem je snazší pasivní difuze a lepší absorpce.

Po absorbování flavonoidy z části podstupují 1. fázi metabolismu zejména v játrech, např. oxidací či demethylací pomocí enzymů cytochromu P450. 2. metabolická fáze jasně převládá a zajišťuje konjugaci aglykonu (případně metabolitu) pomocí příslušných enzymů (např. glukuronyltransferázou, sulfotransferázou, katechol-O-methyltransferázou (COMT)). Mezi konjugáty nejčastěji vznikají glukuronidy a sulfáty. Informace o průniku do tkání téměř nejsou k dispozici. Exkrece probíhá ledvinami do moči nebo mohou být žlučí transportovány zpět do střevního lumen a případně podstoupit enterohepatální oběh (Cassidy a Minihane 2016, Crozier et al. 2010, Erdman et al. 2007, Khan et al. 2021, Murota et al. 2018).

Velký podíl flavonoidů se v tenkém střevě neabsorbují, látky se dostávají až do tlustého střeva, kde jsou štěpeny střevním mikrobiomem za vzniku malých fenolických metabolitů. Mezi skupinami jsou značné rozdíly. U flavonolů (např. kvercetin) převažují deriváty kyseliny hydroxyfenyloctové, u flavonů (např. luteolin) deriváty kyseliny hydroxyfenylpropionové, u isoflavonů (např. daidzein) to jsou ekvol a O-desmetylangolensin (Feng 2018). Vzniklé metabolity se mohou jak absorbovat, tak konjugovat za vzniku zejména glukuronidů a sulfátů.

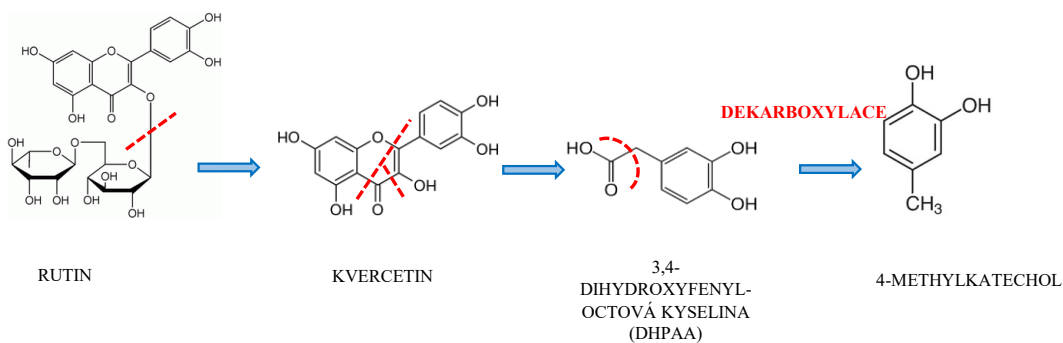
Farmakokinetické informace nejsou vždy dostupné. Studie prokázala, že nejvyšší koncentrace kvercetinu v plazmě bylo dosaženo po 8 hodinách od konzumace potravy bohaté na obsah flavonoidů (Mannen et al. 2019). Z výsledků další studie vyplývá, že při podání 150 mg kvercetinu 6 zdravým subjektům je plazmatická koncentrace dosažená po 30 minutách od podání přibližně 4,66 μM , zároveň byly zjištěny hladiny vzniklých metabolitů – isorhamnetin (0,16 μM), tamarixetin (0,24 μM) (Di Lorenzo et al. 2021, Hollman 2004). Obecně se uvádí, že po konzumaci 10-100 mg polyfenolických sloučenin dosahuje jejich koncentrace v plazmě hodnoty okolo 1 μM (Stromsnes et al. 2021). Důležitou informací však je, že kolonické metabolity flavonoidů dosahují vyšších koncentrací v plazmě než parentní látky. Relativně nedávný výzkum ukázal, že mohou být biologicky aktivní a výrazně se tak podílet na pozitivních účincích flavonoidů (Feng et al. 2018, Murota et al. 2018). Potkanům o průměrné hmotnosti 460 g byly podávány metabolity flavonoidů v dávce 5 mg/kg a následně byly odebírány vzorky krve z pravé karotidy v určitých časových intervalech. Konkrétně u 4-methylkatecholu (4-MC), který byl testován v této práci,

bylo zjištěno, že plazmatická hladina vzniklého konjugátu (4-MC sulfát) byla přibližně 3,5 μM (Pourová et al. 2018).

Za zmínku stojí střevní mikrobiom jako takový. Pro metabolizaci flavonoidních struktur je zcela zásadní – probíhají zde jednotlivé transformační kroky zajišťující vznik nízkomolekulárních fragmentů. U každého jednotlivce metabolismus probíhá rozdílně, jelikož střevní mikroflóra je ovlivněna mnoha faktory a je proto variabilní (Cassidy a Minihane 2016). K hlavním faktorům patří věk, pohlaví, etnikum, genotyp, složení potravy a případně léčiva. Například metabolit ekvol nacházíme výrazně více u Asiatů než u bělochů (Setchell 2010). Metabolismus kvercetinu je podrobně zobrazen na *Obr. 8*.

3.7.3. 4-methylkatechol

Katecholy patří mezi malé kolonické metabolity flavonoidů (Pourová et al. 2018). Konkrétně 4-methylkatechol je společně s kyselinou 3,4-dihydroxyfenyloctovou hlavním metabolitem rutinu a kvercetin (aglykon rutinu) – viz Obr. 9 (Guo et al. 2021, Spencer a Crozier 2012).



Obrázek 9 - Metabolismus rutinu

Převzato a modifikováno z: Guo et al. (2021)

Glykosidické vazby v rutinu jsou v tlustém střevě štěpeny činností bakteriálních enzymů – rhamnosidáz a glukosidáz. Kvercetin jako aglykon rutinu je farmakologicky aktivní. Má prokázané antioxidační vlastnosti a podílí se také na zvýšení glukózové absorpce. Významná je rovněž jeho schopnost urychlit uvolňování insulinu a zvyšovat senzitivitu buněk vůči tomuto hormonu (Guo et al. 2021). Kvercetin má také antihypertenzní účinky, které jsou založeny na regulaci cévní poddajnosti a cévního odporu, ovlivněním vegetativního nervového systému a renin-angiotensin-aldosteronového systému (Batiha et al. 2020, Marunaka et al. 2017, Najmanová 2018, Spencer a Crozier 2012). Nicméně jeho pozitivním účinkům neodpovídá jeho relativně nízká biodostupnost a absorpce (Wang et al. 2022) (viz výše).

Účinky kvercetinu by mohly být zčásti vysvětleny existencí aktivních metabolitů, mezi nimi 4-methylkatecholu (chemická struktura viz Obr. 10).

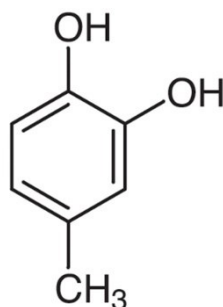
4-methylkatechol vykazuje řadu pozitivních účinků: inhibuje růst nádorových buněk melanocytů navozením jejich apoptózy a je inhibitorem srážení krevních destiček

(Applová et al. 2019, Hrubša et al. 2022, Payton et al. 2011). Je potenciálním stimulatorem tzv. NGF faktoru – endogenního nervového růstového faktoru. Nedostatek tohoto faktoru hraje roli v patogenezi diabetických neuropatií. Zvýšená tvorba faktoru díky 4-methylkatecholu může tedy působit jako prevence dysfunkce periferních nervů, tuto skutečnost potvrdila řada *in vitro* a *in vivo* experimentů (Abbaszadeh-Goudarzi et al. 2021, Hanaoka et al. 1994).

4-MC má také význam ve farmakoterapii tumoru beta buněk slinivky břišní (inzulinomu) charakteristického nadměrnou produkcí inzulinu. 4-methylkatechol dokáže apoptickými mechanismy tyto nádorové buňky zničit (Karatug Kacar et al. 2018).

Dalším zjištěným efektem této látky je schopnost zlepšit stavy spojené s chronickou bolestí. Neuropatická bolest je závažným klinickým problémem, který výrazně negativně ovlivňuje kvalitu života pacientů. Nedostatek tzv. BDNF faktoru v limbickém systému v těle spouští kaskádu vedení bolesti a spojuje ji zároveň s emocionálním vnímáním. 4-methylkatechol dokáže hladinu právě tohoto faktoru zvyšovat (Fukuhara et al. 2012).

Pracovní skupina kardiovaskulární a respirační farmakologie nedávno zjistila, že 4-MC má účinky vasodilatační *ex vivo* a dokáže snižovat krevní tlak *in vivo* (Pourová et al. 2018).



Obrázek 10 - Chemická struktura 4-methylkatecholu (4-methylbenzen-1,2-diol)

Převzato z: tcichemicals.com

4. CÍL PRÁCE

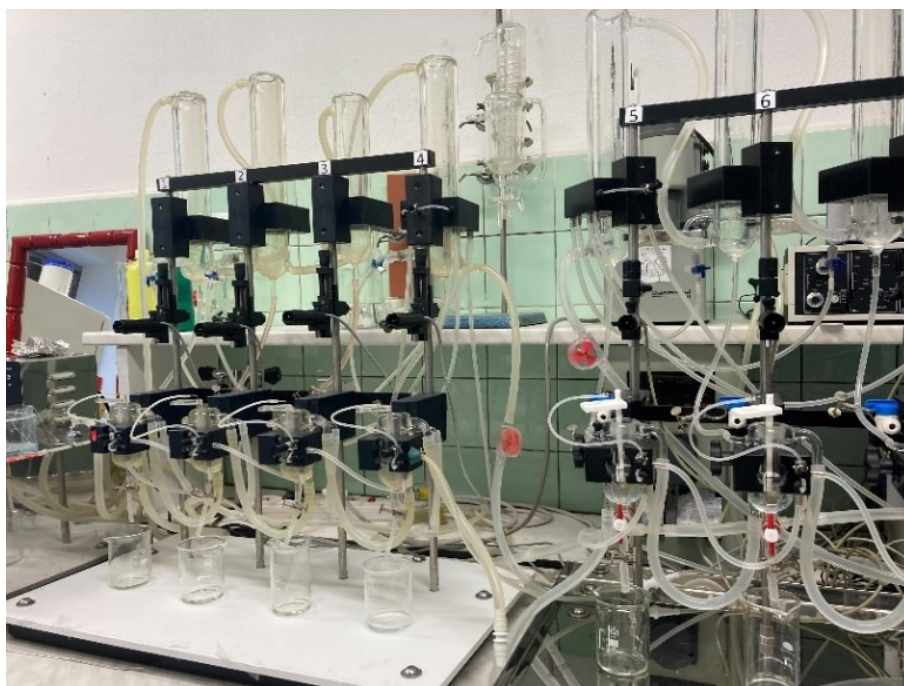
Hlavním cílem experimentální části této diplomové práce bylo objasnit možný mechanismus vasodilatačního působení kolonického metabolitu flavonoidů – 4-methylkatecholu. Pro práci byla použita standardizovaná metoda *ex vivo* na izolované potkaní aortě. Z předpokusů jsme již věděli, že vasodilatační efekt 4-methylkatecholu je na endotelu nezávislý, proto jsme se zaměřili přímo na hladký cévní sval.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Použitý materiál

5.1.1. Laboratorní přístroje a pomůcky

- sklo – odměrné válce, kádinky, Petriho misky, sady zkumavek, tyčinky
- váhy laboratorní *Kern & Sohn GmbH* (Balingen, Německo)
- váhy analytické *Explorer Analytical*
- ostatní pomůcky – buničina, lžičky k navažování, Eppendorf zkumavky, pinzety, pipety, špičky, stříkačky, rukavice, dentální nit, svorky
- operační pomůcky – stolek, nůžky, pinzety, jehly, pean
- aparatura na izolovanou tkáň (viz Obr. 11) – *Multi chamber tissue bath system* (Experimentia Ltd, Budapešť, Maďarsko)
- třepačka *IKA Vortex Genius 3*
- počítač, software pro vyhodnocení výsledků – *S.P.E.L., Advanced Kymograph Software v. 3.2* (Experimentia Ltd, Budapešť, Maďarsko)
- software *GraphPad Prism 9*
- počítačový program *Excel*
- Force/Displacement transducer (Experimentia Ltd, Budapešť, Maďarsko)
- termostat U1, plynová láhev se směsí O₂ (95 %) a CO₂ (5 %) (Linde gas, Česká republika)



Obrázek 11 - Aparatura na izolovanou tkáň - Multi chamber tissue bath system

Převzato z: vlastní fotografie (Laboratoř Katedry farmakologie a toxikologie na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové Univerzity Karlovy)

5.1.2. Chemikálie

Pro experimentální část práce byly využívány následující chemikálie – Krebsův živný roztok, vasoaktivní látky se schopností ovlivňovat hladký cévní sval, sloučenina pro navození anestezie zvířete, antikoagulační látka, vybraný testovaný derivát flavonoidů. Všechny zmíněné chemikálie jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 6-10):

NÁZEV SLOUČENINY	SUMÁRNÍ VZOREC	MOLEKULOVÁ HMOTNOST (g/mol)	VÝROBCE
chlorid sodný p.a.	NaCl	58,44	Penta Chrudim, Česká republika
chlorid draselný p.a.	KCl	74,56	Lachema Brno, Česká republika
chlorid vápenatý bezvodý p.a.	CaCl ₂	110,99	Lachema Brno, Česká republika
hydrogenuhličitan sodný p.a.	NaHCO ₃	84,01	Penta Chrudim, Česká republika
dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH ₂ PO ₄	136,09	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česká republika
síran hořečnatý heptahydrát p.a.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,47	Lachema Brno, Česká republika
D-glukóza monohydrát p.a.	C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	180,16	Penta Chrudim, Česká republika

Tabulka 6 - Složení Krebsova roztoku

NÁZEV SLOUČENINY	SUMÁRNÍ VZOREC	MOLEKULOVÁ HMOTNOST (g/mol)	VÝROBCE
destilovaná voda	H ₂ O	18,02	Katedra biochemických věd, FaF UK HK
miliQ voda	H ₂ O	18,02	Katedra biochemických věd, FaF UK HK
dimethylsulfoxid	(CH ₃) ₂ SO	78,13	Sigma-Aldrich, Německo

Tabulka 7 - Použitá rozpouštědla

NÁZEV SLOUČENINY	SUMÁRNÍ VZOREC	MOLEKULOVÁ HMOTNOST (g/mol)	VÝROBCE
noradrenalin bitartát monohydrát p.a.	$C_8H_{11}NO_3 \cdot C_4H_6O_6 \cdot H_2O$	337,28	Sigma-Aldrich, Německo
acetylcholin jodid p.a.	$(CH_3)_3N(I)CH_2CH_2OCOCH_3$	273,10	Sigma-Aldrich, Německo
nitroprusid sodný dihydrát p.a.	$Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$	297,95	Sigma-Aldrich, Německo
nifedipin	$C_{17}H_{18}N_2O_6$	346,34	Sigma-Aldrich, Německo
chlorid barnatý	$BaCl_2$	208,23	Sigma-Aldrich, Německo
iberiotoxin	$C_{179}H_{274}N_{50}O_{55}S_7$	4231	Sigma-Aldrich, Německo
linopirdin	$C_{26}H_{21}N_3O$	391,50	Sigma-Aldrich, Německo
glibenklamid	$C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$	494,004	Sigma-Aldrich, Německo
ODQ	$C_9H_5N_3O_2$	187,15	Sigma-Aldrich, Německo
Rp-8-pCPT-sGMPS	$C_{16}H_{14}ClN_5NaO_6PS_2$	525,86	Tocris Bioscience, Velká Británie
DT-3	$C_{152}H_{258}N_{52}O_{28}S$	3294,07	Sigma-Aldrich, Německo
4-aminopyridin	$C_5H_6N_2$	94,12	Sigma-Aldrich, Německo
forskolin	$C_{22}H_{34}O_7$	410,51	Sigma-Aldrich, Německo
BayK-8644	$C_{16}H_{15}F_3N_2O_4$	356,30	Sigma-Aldrich, Německo

Tabulka 8 - Vasoaktivní látky

NÁZEV SLOUČENINY	SUMÁRNÍ VZOREC	MOLEKULOVÁ HMOTNOST (g/mol)	VÝROBCE
ANESTEZIE uretan	$C_3H_7NO_2$	89,09	Sigma-Aldrich, Německo
ANTIKOAGULANS heparin	$C_{12}H_{19}NO_{20}S_3$	12 000 - 15 000	Zentiva, Česká republika
TESTOVANÁ SLOUČENINA 4-methylcatechol	$C_7H_8O_2$	124,14	Sigma-Aldrich, Německo

Tabulka 9 - Další chemikálie

NÁZEV LÁTKY	ROZPOUŠTĚDLO	NÁSLEDNÉ ŘEDĚNÍ
forskolin	DMSO	Krebsův roztok
ODQ	DMSO	Krebsův roztok
DT-3	DMSO	Krebsův roztok
Rp-8-pCPT-sGMPS	DMSO	Krebsův roztok
BayK-8644	DMSO	Krebsův roztok
glibenklamid	DMSO	Krebsův roztok
linopirdin	DMSO	Krebsův roztok
iberiotoxin	miliQ voda	Krebsův roztok
BaCl ₂	miliQ voda	Krebsův roztok
NTS	miliQ voda	Krebsův roztok
4-aminopyridin	miliQ voda	Krebsův roztok

Tabulka 10 - Připravené základní roztoky

5.1.3. Zvířata

K našim experimentálním účelům jsme využili potkaní samce kmene Wistar (Charles River, Düsseldorf, Německo), hmotnost zvířat byla mezi 300-400 g. Zvířata byla vždy po dobu alespoň jednoho týdne chovaná ve viváriu na Farmaceutické fakultě pro aklimatizaci, chov probíhal za standardních podmínek při teplotě 23-25 °C s volným přístupem k potravě a vodě.

Celý experiment se řídil platnými legislativními opatřeními – konkrétně zákonem č. 246/1992 Sb. *O ochraně zvířat proti týrání* a probíhal se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

5.2. Metodika

5.2.1. Krebsův živný roztok

Izotonický Krebsův roztok (pH 7,4) byl při experimentální části základním živným médiem pro izolovanou tkáň. Toto médium svými vlastnostmi vytvořilo podmínky simulující vnitřní prostředí organismu – složení a hodnota pH se podobá lidské plazmě. Jeho příprava spočívala v rozpuštění navážek uvedených látek v menším množství destilované vody (viz Tab. 11). Jedině chlorid vápenatý bylo potřeba rozpustit samostatně zvlášť, abychom se tak vyvarovali vzniku sraženiny této vápenaté soli. Takto připravené dva samostatné roztoky byly společně smíchány a destilovanou vodou doplněny do požadovaného objemu.

NÁZEV SLOUČENINY	SUMÁRNÍ VZOREC	KONCENTRACE (g/l)
chlorid sodný p.a.	NaCl	5,54
chlorid draselný p.a.	KCl	0,35
chlorid vápenatý bezvodý p.a.	CaCl ₂	0,28
hydrogenuhličitan sodný p.a.	NaHCO ₃	2,10
dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH ₂ PO ₄	0,16
síran hořečnatý heptahydrát p.a.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,29
D-glukóza monohydrát p.a.	C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O	2,10

Tabulka 11 - Krebsův roztok

5.2.2. Vlastní experiment

Anestezie zvířete a příprava tkáně

Poté, co byl potkan ponechán jeden den bez potravy, byl následně uspán intraperitoneálním podáním uretanu (dávka 1,2 g/kg), používali jsme roztok tohoto anestetika o koncentraci 20 g/100 ml, přičemž objem roztoku jsme určili podle přesné hmotnosti potkana. S uspaným zvířetem jsme pracovali na operačním stolku, nastříhli jsme kožní řasu v oblasti břicha a zvíře bylo po intravenózní aplikaci heparinu usmrceno vykrvením. Krev byla použita pro další výzkumné účely. Hrudní aorta (*aorta thoracica*) byla opatrně vypreparována a ihned ponořena do připravené Petriho misky s Krebsovým živným roztokem. Následně byla aorta pečlivě očištěna od okolního tuku a pojivové tkáně, dále jsme ji nastříhali na jednotlivé zhruba 3 mm dlouhé úseky (aortální kroužky). Při pokusech jsme testovali cévu bez endotelové vrstvy, endotel byl šetrně odstraněn z lumen cévy pomocí dentální nitě. Každý kroužek byl v aparatuře upevněn systémem dvou háčků – jeden spojený s pevným nosičem, druhý chirurgickou nití spojený převodníkem s počítačem (Kudo et al. 2021, Rameshrad et al. 2016).

Stabilizace izolované tkáně

Jednotlivé háčky s připevněnou tkání jsme ponořili do lázně s 5 ml Krebsova roztoku. Údaje o odpovědi cévy (kontrakci či dilataci) byly pomocí převodního systému z tenké nitky háčku předávány do počítačového softwaru a programem dále zpracovány. Celá aparatura zajišťovala izolovaným aortálním kroužkům fyziologické podmínky – Krebsův roztok pro fyziologické pH a iontové složení, glukóza, vyhřívaná vodní lázeň zajišťující teplotu podobnou teplotě organismu (37 °C) a zásobení pneumoxidem z tlakové lahve. Na aparatuře bylo nastaveno po půlminutových intervalech postupně napětí všech kroužků na hodnotu 2,0 g a takto jsme jednotlivé kroužky nechali stabilizovat přibližně 40-45 minut, během této doby byl vždy po 10 minutách v každé komůrce proveden výplach Krebsova roztoku (Bonaventura et al. 2008, Gonzales et al. 2000, Rameshrad et al. 2016). Po stabilizaci vzorku tkáně bylo potřeba postupně snížit napětí na bazální hodnotu 1,0 g a poté komůrky znovu naplnit 5 ml Krebsova roztoku.

Úvodní testování kontraktility tkáně

Pro otestování schopnosti izolovaného vzorku se kontrahovat byl na začátku každého experimentu použit noradrenalin (50 μl , finální koncentrace v komůrce $1\mu\text{mol.l}^{-1}$). Kontrakci vyvolal vazbou na receptory α_1 spojené s G proteinem, depolarizací plazmatické membrány, otevřením napěťově řízených vápenatých kanálů a influxem vápníku (Palacios et al. 2013). Jakmile byla odpověď tkáně stabilní (zhruba po 30 minutách), přidali jsme následně do komůrek acetylcholin (50 μl , konečná koncentrace v komůrce $100\mu\text{mol.l}^{-1}$), abychom otestovali neporušenost endotelu (Gonzales et al. 2000). V případě přítomnosti funkčního endotelu acetylcholin vyvolá vasorelaxaci. Vzorky při přípravě zbavené funkčního endotelu na acetylcholin nereagovaly (Mishra et al. 2000). Poté byly jednotlivé komůrky Krebsovým roztokem několikrát vymyty a na závěr opět naplněny přesně 5 ml Krebsova roztoku, a tak mohl být zahájen vlastní experiment k určení mechanismu účinku 4-MC.

Vlastní pokus a testované mechanismy

Pracovali jsme vždy s tkání zbavenou funkčního endotelu, protože jsme z předpokusů věděli, že vasodilatační účinek 4-MC je na přítomnosti endotelu nezávislý. V jedné pokusné skupině byly vždy použity nejméně čtyři kroužky aorty z nejméně tří různých zvířat. Testovaný metabolit 4-MC byl vždy čerstvě rozpuštěn v DMSO na koncentraci 10mmol.l^{-1} a Krebsovým roztokem dále ředěn na potřebné koncentrace. Vasoaktivní látky byly rozpuštěny v DMSO nebo vodě miliQ a dále naředěny Krebsovým roztokem (viz Tab. 10). Jako kontrola bylo používáno pouze rozpouštědlo. Finální koncentrace DMSO v komůrce nebyla nikdy vyšší než 2 %. Pokus byl realizován bezprostředně po úvodním otestování kontraktility tkáně a ověření nefunkčnosti endotelu. Většina pokusů byla založena na relaxaci prekontrahovaného kroužku aorty pomocí vasorelaxační látky. V jednom protokolu byla naopak navozovaná kontrakce. Vasoaktivní látka byla přidávána buď jednorázově nebo kumulativně jako více dávek. Další dávku jsme přidávali vždy až v momentě, kdy došlo k ustálení tkáňové odpovědi na dávku předchozí. V případě jednorázového podání 4-MC jsme při volbě koncentrace vycházeli z předchozích pokusů (nebyly součástí této diplomové práce). Byla použita buď koncentrace $15\mu\text{mol.l}^{-1}$ (odpovídá $\sim\text{EC}_{20}$) nebo $70\mu\text{mol.l}^{-1}$ (odpovídá $\sim\text{EC}_{80}$). Na závěr pokusu byl pro navození maximální relaxace tkáně použit

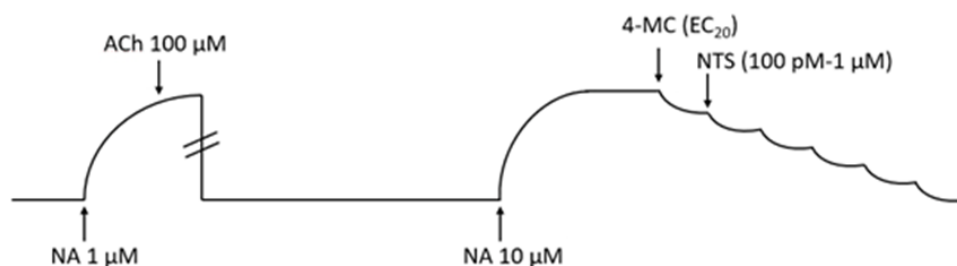
nitroprusid sodný ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) nebo k navození kontrakce KCl (60mmol.l^{-1}) (Herrera et al. 1996, Kudo et al. 2021).

Postupně byly použity tyto protokoly:

1. Schopnost 4-MC potencovat vasodilatační účinky NO

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali noradrenalin ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) k navození kontrakce a počkali na dosažení plató fáze. Následně jsme přidali 4-MC (koncentrace v komůrce $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$ odpovídající $\sim\text{EC}_{20}$) a vyčkali jsme na stabilizaci odpovědi.

Jako kontrola bylo přidáno samotné rozpouštědlo. Poté jsme do lázně kumulativně přidávali nitroprusid sodný ($100 \text{pmol.l}^{-1} - 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$) pro postupné navození vasodilatace (viz. Obr. 12).

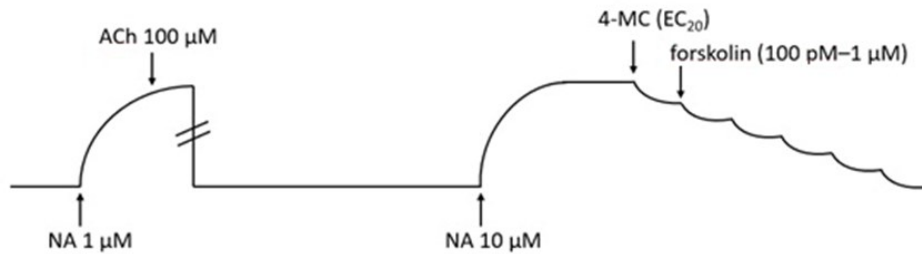


Obrázek 12 - Schéma pokusu, který ověřuje schopnost 4-MC potencovat vasodilatační účinky NO

2. Schopnost 4-MC potencovat vasodilatační účinky po aktivaci dráhy cAMP

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali noradrenalin ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) k navození kontrakce a počkali na dosažení plató fáze. Následně jsme přidali 4-MC (koncentrace v komůrce $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$ odpovídající $\sim\text{EC}_{20}$) a vyčkali jsme na stabilizaci odpovědi.

Jako kontrola bylo přidáno samotné rozpouštědlo. Poté jsme do lázně kumulativně přidávali forskolin (100 pmol.l⁻¹ – 1 μmol.l⁻¹) pro postupné navození vasodilatace (viz Obr. 13).

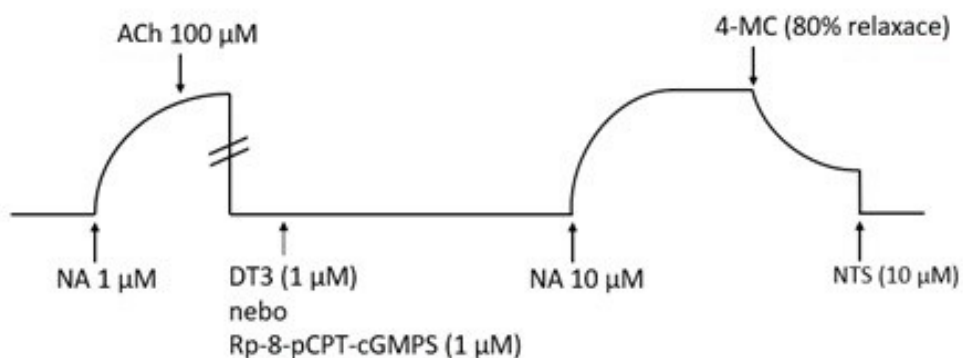


Obrázek 13 - Schéma pokusu, který ověřuje schopnost 4-MC potencovat vasodilatační účinky po aktivaci dráhy cAMP

3. Je vasodilatace navozená 4-MC zprostředkovaná aktivací proteinkinázy G?

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do nádobek přidali odděleně dva inhibitory PKG: DT-3 nebo Rp-8-pCPT-cGMPS (oba v koncentraci 1 μmol.l⁻¹) a nechali tkáň inkubovat 30 minut.

Jako kontrola bylo přidáno samotné rozpouštědlo. Kontrakce byla navozena noradrenalinem (10 μmol.l⁻¹). Po stabilizaci odpovědi jsme jednorázově přidali 4-MC k navození relaxace (70 μmol.l⁻¹ ~EC₈₀). Na závěr byla maximální relaxace dosažena přidáním nitroprusidu sodného (10 μmol.l⁻¹) (viz Obr. 14).

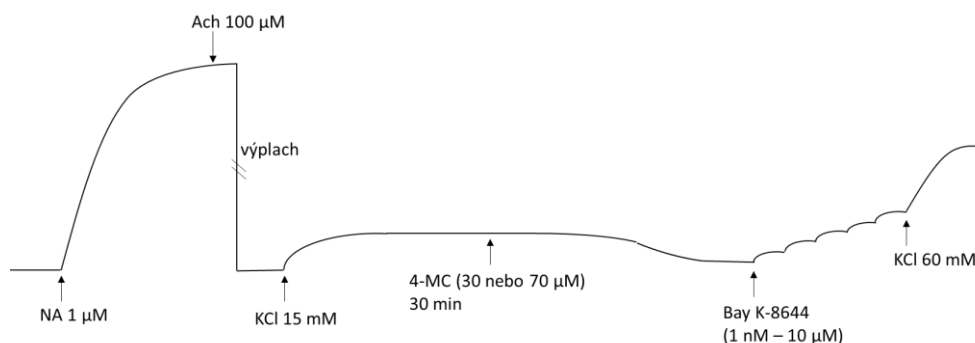


Obrázek 14 - Schéma pokusu, který ověřuje, zda je vasodilatace navozená 4-MC zprostředkovaná aktivací proteinkinázy G

4. Schopnost 4-MC blokovat vápníkové kanály L-typu

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali KCl (15 mmol.l⁻¹) a počkali na stabilizaci odpovědi (draselné kationty podpoří depolarizaci a zvýrazní později navozovanou vasokonstrikci). Následně jsme po dobu 30 minut inkubovali tkáň s 4-MC ve dvou různých koncentracích (30 μmol.l⁻¹ nebo 70 μmol.l⁻¹ ~EC₈₀).

Jako pozitivní kontrola byl použit známý blokátor vápníkových kanálů, nifedipin (150 nmol.l⁻¹). Negativní kontrolou bylo čisté rozpouštědlo. Potom jsme do lázně postupně přidávali kumulativně ve vzrůstající koncentraci agonistu vápníkových kanálů L-typu, BayK-8644 (1 nmol.l⁻¹ – 10 μmol.l⁻¹), k navození kontrakce. Pokus probíhal za tmy, protože látka BayK-8644 je citlivá na světlo. V závěru jsme použili KCl (60 mmol.l⁻¹) pro navození maximální kontrakce (viz Obr. 15).



Obrázek 15 - Schéma pokusu, který ověřuje schopnost 4-MC blokovat vápníkové kanály L-typu

5. Je vasodilatace navozená 4-MC zprostředkována aktivací solubilní guanylátcyklázy?

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali blokátor solubilní guanylátcyklázy, ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on) (1 μmol.l⁻¹), a inkubovali tkáň 30 minut. Následně byla navozena kontrakce noradrenalinem (10 μmol.l⁻¹). Po stabilizaci vasokonstrikční odpovědi jsme kumulativně přidávali 4-MC (100 nmol.l⁻¹ – 100 μmol.l⁻¹) k postupnému navození vasodilatace. Na závěr byla maximální relaxace dosažena pomocí nitroprusidu sodného (10 μmol.l⁻¹) (viz Obr. 16).

6. Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály BK_{Ca} na hladkém cévním svalu?

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali blokátor kanálů BK_{Ca}, iberiotoxin (100 nmol.l⁻¹), a inkubovali tkáň po dobu 30 minut. Následně byla navozena kontrakce noradrenalinem (10 μmol.l⁻¹). Po stabilizaci vasokonstriční odpovědi jsme kumulativně přidávali 4-MC (100 nmol.l⁻¹ – 100 μmol.l⁻¹) k postupnému navození vasodilatace. Na závěr byla maximální relaxace dosažena pomocí nitroprusidu sodného (10 μmol.l⁻¹) (*viz Obr. 16*).

7. Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály K_{ir} na hladkém cévním svalu?

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali blokátor kanálů K_{ir}, BaCl₂ (50 μmol.l⁻¹), a inkubovali tkáň po dobu 30 minut. Následně byla navozena kontrakce noradrenalinem (10 μmol.l⁻¹). Po stabilizaci vasokonstriční odpovědi jsme kumulativně přidávali 4-MC (100 nmol.l⁻¹ – 100 μmol.l⁻¹) k postupnému navození vasodilatace. Na závěr byla maximální relaxace dosažena pomocí nitroprusidu sodného (10 μmol.l⁻¹) (*viz Obr. 16*).

8. Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály K_{ATP} na hladkém cévním svalu?

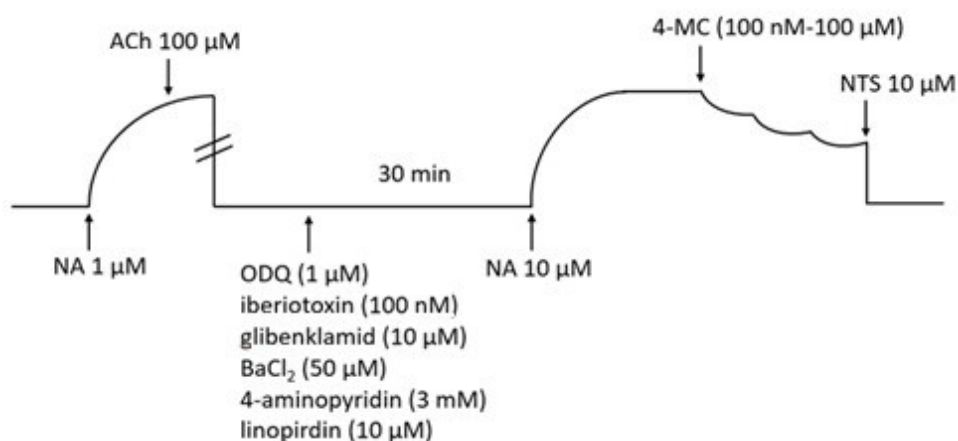
Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali blokátor kanálů K_{ATP}, glibenklamid (10 μmol.l⁻¹), a inkubovali tkáň po dobu 30 minut. Následně byla navozena kontrakce noradrenalinem (10 μmol.l⁻¹). Po stabilizaci vasokonstriční odpovědi jsme kumulativně přidávali 4-MC (100 nmol.l⁻¹ – 100 μmol.l⁻¹) k postupnému navození vasodilatace. Na závěr byla maximální relaxace dosažena pomocí nitroprusidu sodného (10 μmol.l⁻¹) (*viz Obr. 16*).

9. Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály Kv na hladkém cévním svalu?

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali blokátor kanálů K_v , 4-aminopyridin (3 mmol.l^{-1}), a inkubovali tkáň po dobu 30 minut. Následně byla navozena kontrakce noradrenalinem ($10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Po stabilizaci vasokonstriční odpovědi jsme kumulativně přidávali 4-MC ($100 \text{ nmol.l}^{-1} - 100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) k postupnému navození vasodilatace. Na závěr byla maximální relaxace dosažena pomocí nitroprusidu sodného ($10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) (viz Obr. 16).

10. Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály Kv7 na hladkém cévním svalu?

Po úvodním ověření nepřítomnosti funkčního endotelu jsme do lázně přidali blokátor kanálů K_v7 , linopirdin ($10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), a inkubovali tkáň po dobu 30 minut. Následně byla navozena kontrakce noradrenalinem ($10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Po stabilizaci vasokonstriční odpovědi jsme kumulativně přidávali 4-MC ($100 \text{ nmol.l}^{-1} - 100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) k postupnému navození vasodilatace. Na závěr byla maximální relaxace dosažena pomocí nitroprusidu sodného ($10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$) (viz Obr. 16).



Obrázek 16 - Schéma popisující ověření mechanismů pokusů 5-10

Vyhodnocení získaných výsledků

Výsledky jsme vyhodnocovali pomocí počítačových programů Excel a GraphPad Prism 9. Navozená dilatace tkáně byla přepočítána na procenta z maximální dilatace anebo z prekontrakce a zjištěné hodnoty zaneseny do grafu závislosti na logaritmické koncentraci látky použité k vyvolání relaxace (podle protokolu 4-MC, nitroprusid sodný nebo forskolin). Získali jsme tak relaxační křivku a z ní určili hodnotu EC_{50} neboli koncentraci vyvolávající 50% relaxaci. Pro každou křivku jsme určili 95% konfidenční intervaly. Při testování vlivu 4-MC na PKG byla podána pouze jedna dávka 4-MC vyvolávající přibližně 80% vasodilataci a účinek vyjádřen jako % z maximální možné vasodilatace. V případě testování vlivu na vápníkové kanály L-typu jsme hodnotili kontrakci navozenou agonistou BayK-8644 jako % z maximální možné kontrakce. Postup pro jednotlivé protokoly je uveden zde:

Protokoly 1 a 2: Dilataci navozenou nitroprusidem sodným nebo forskolinem jsme vyjádřili jako % z prekontrakce. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů.

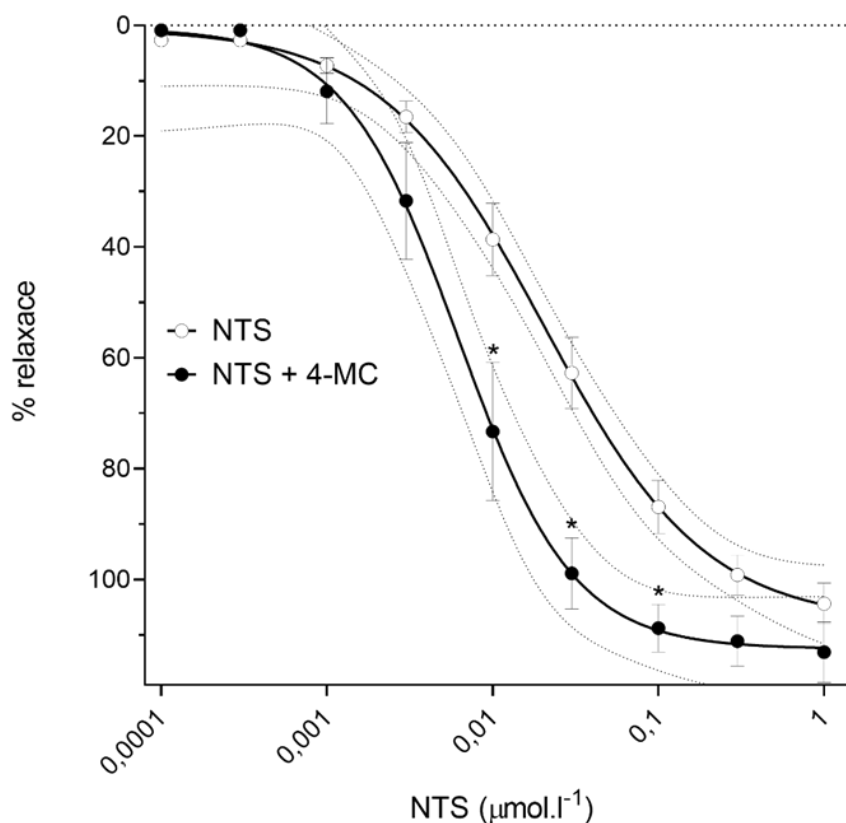
Protokol 3: Dilataci navozenou jednou dávkou 4-MC jsme vyjádřili jako % z maximální možné. Za maximální dilataci jsme považovali tu, kterou navodí nitroprusid sodný ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Významnost jsme hodnotili pomocí testu t-testu.

Protokol 4: Kontrakci navozenou BayK-8644 jsme vyjádřili jako % z maximální možné. Za maximální kontrakci jsme považovali tu, kterou navodí KCl (60 mmol.l^{-1}). Významnost jsme hodnotili pomocí testu two-way ANOVA s následným Dunnettovým testem.

Protokoly 5-10: Dilataci navozenou 4-MC jsme vyjádřili jako % z maximální možné. Za maximální dilataci jsme považovali tu, kterou navodí nitroprusid sodný ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů.

5.2.3. Výsledky

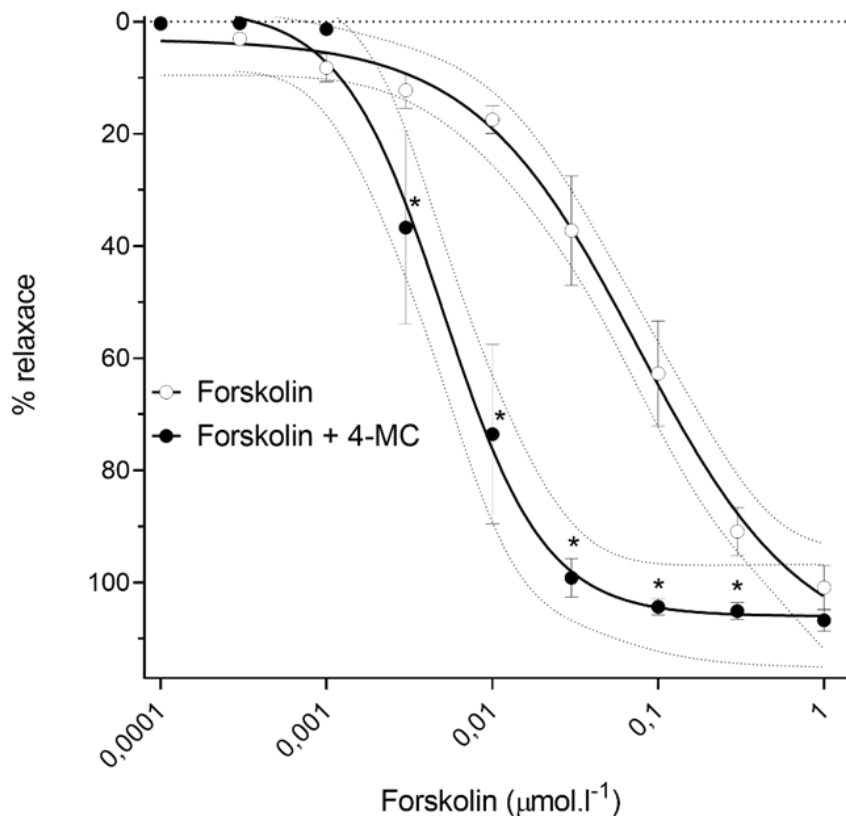
Protokol č. 1 – Dokáže 4-MC potencovat vasodilatační účinky NO?



Graf 1. Vliv přítomnosti 4-methylcatecholu (4-MC) na vasodilatační účinky nitroprusidu sodného (NTS).

Graf znázorňuje relaxaci navozenou podáním donoru NO, NTS ($0,0001 - 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$), u kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Pokus probíhal buď za přítomnosti 4-MC ($15 \mu\text{mol.l}^{-1}$) nebo vehikula (kontrola). Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z prekontrakce. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM z 8 měření v obou skupinách, kroužky v jedné skupině byly získány ze čtyř různých zvířat. Body byla proložena relaxační křivka a spočítán konfidenční interval $CI_{95\%}$. Křivky byly považovány za významně odlišné, pokud nedošlo k překryvu konfidenčních intervalů.

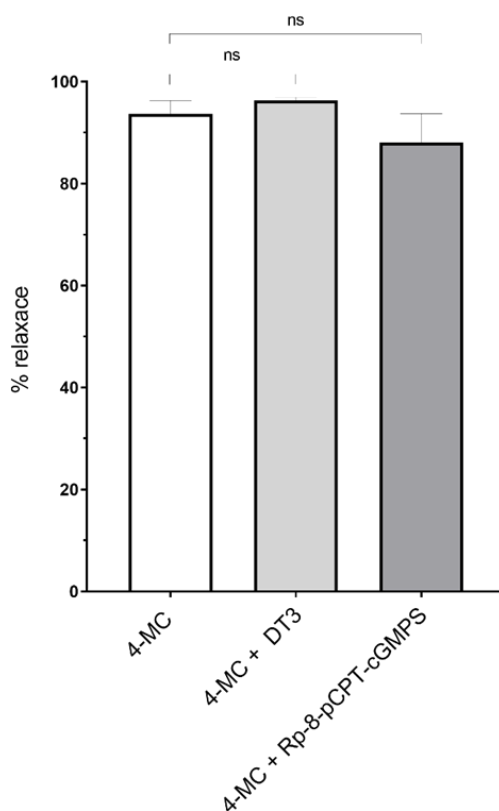
Protokol č. 2 – Dokáže 4-MC potencovat vasodilatační účinky dané aktivací adenylátcyklázy a dráhy cAMP?



Graf 2. Vliv přítomnosti 4-methylcatecholu (4-MC) na vasodilatační účinky po aktivaci dráhy cAMP.

Graf znázorňuje relaxaci navozenou podáním aktivátoru adenylátcyklázy, forskolinu (0,0001 - 1 µmol.l⁻¹), u kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu (10 µmol.l⁻¹). Pokus probíhal buď za přítomnosti 4-MC (15 µmol.l⁻¹) nebo vehikula (kontrola). Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z prekontrakce. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM z 8 měření (4-MC) a ze 7 měření (kontrola), kroužky v jedné skupině byly získány ze čtyř různých zvířat. Body byla proložena relaxační křivka a spočítán konfidenční interval CI_{95%}. Křivky byly považovány za významně odlišné, pokud nedošlo k překryvu konfidenčních intervalů.

Protokol č. 3 – Je vasodilatace navozená 4-MC zprostředkovaná aktivací proteinkinázy G?

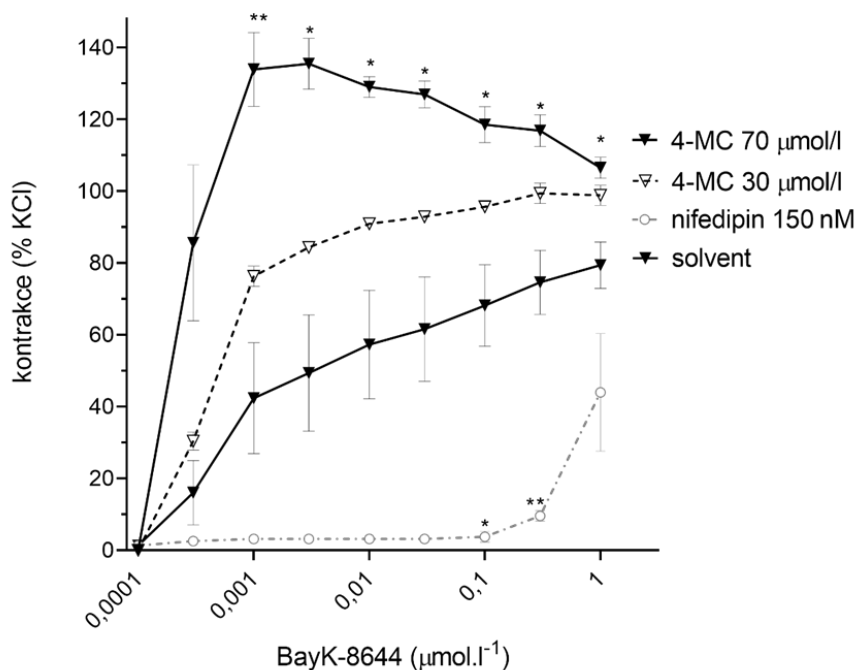


Graf 3. Vliv přítomnosti 4-methylcatecholu (4-MC) na aktivaci proteinkinázy G.

Graf znázorňuje relaxaci navozenou podáním jedné dávky 4-MC ($70 \mu\text{mol.l}^{-1}$) u kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kroužky byly inkubovány v přítomnosti dvou různých inhibitorů PKG, DT3 nebo Rp-8-pCPT-cGMPS (oba v koncentraci $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z maximální možné. Za maximální relaxaci jsme považovali tu, kterou navodí NTS ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Významnost jsme hodnotili pomocí t-testu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ze 4 měření v obou skupinách, kroužky v jedné skupině byly získány ze čtyř různých zvířat.

ns ... nesignifikantní rozdíl

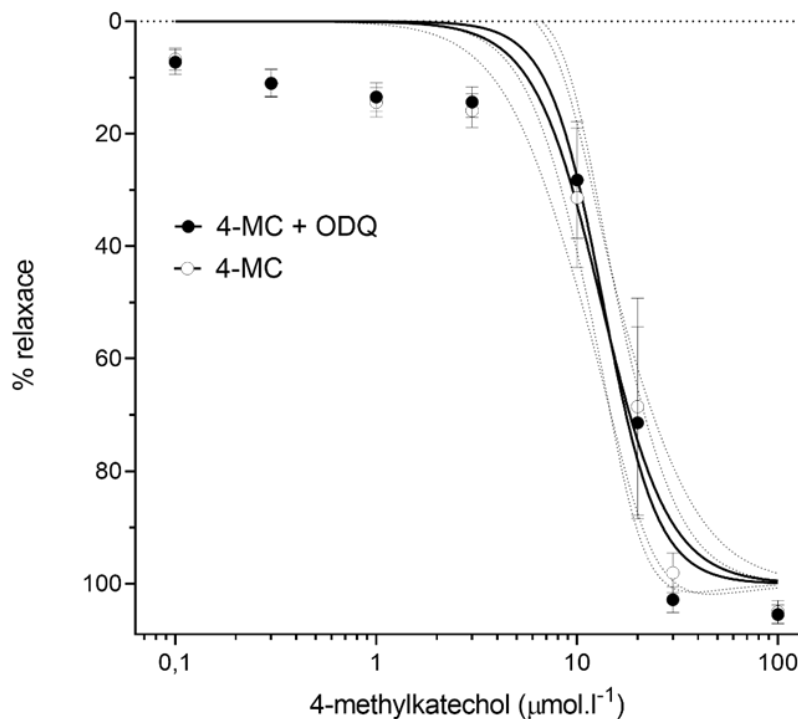
Protokol č. 4 – Dokáže 4-MC blokovat vápníkové kanály L-typu?



Graf 4. Vliv 4-methylkatecholu (4-MC) na L-tyt vápníkových kanálů na hladkém cévním svalu.

V pokusu na kroužcích izolované potkaní aorty *ex vivo* jsme zjišťovali, zda dojde k zablokování vasokonstrikčního účinku aktivátoru vápníkových kanálů L-tytu, BayK-8644, předchozí inkubací s 4-MC ve dvou koncentracích ($30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ nebo $70 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Jako pozitivní kontrola byl použit nifedipin (150 nmol.l^{-1}), negativní kontrolou bylo rozpouštědlo. Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Graf znázorňuje závislost navozené vasokonstrikce na koncentraci BayK-8644 ($0,0001 - 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kontrakci navozenou BayK-8644 jsme vyjádřili jako % z maximální možné. Za maximální kontrakci jsme považovali tu, kterou navodil KCl (60 mmol.l^{-1}). Významnost jsme hodnotili pomocí testu two-way ANOVA s následným Dunnetovým testem. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ze 4 měření ve všech skupinách, kroužky v jedné skupině byly získány ze čtyř různých zvířat. * $P \leq 0,05$ a ** $P \leq 0,01$.

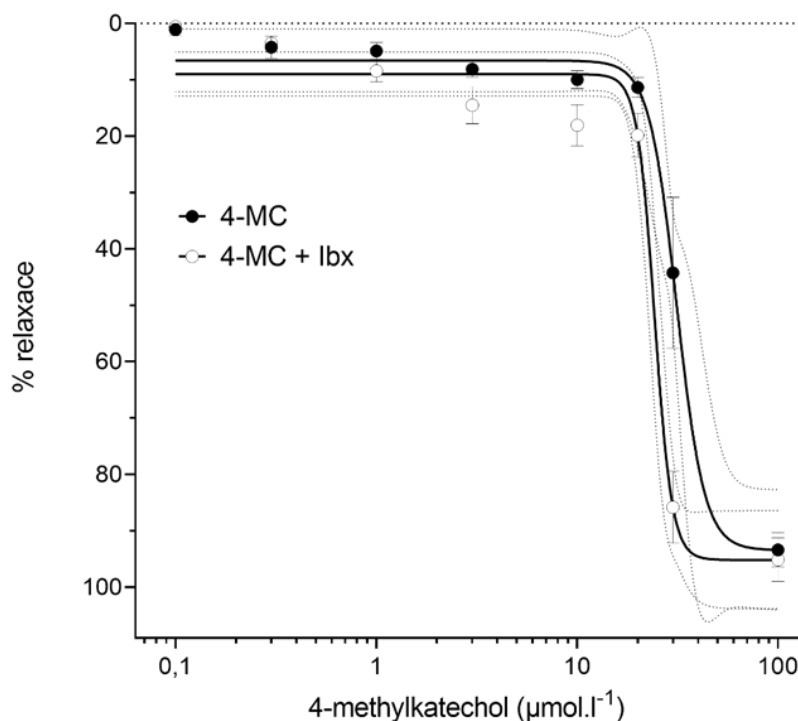
Protokol č. 5 – Je vasodilatace navozená 4-MC zprostředkovaná aktivací solubilní guanylátcyklázy?



Graf 5. Vliv 4-methylkatecholu (4-MC) na aktivaci solubilní guanylátcyklázy (sGC).

Graf znázorňuje vasorelaxaci kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) navozenou kumulativním podáním 4-MC ($0,1 - 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kroužky byly 30 minut inkubovány s inhibítorem sGC, ODQ ($1 \mu\text{mol.l}^{-1}$), nebo s rozpouštědlem. Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z maximální možné. Za maximální vasorelaxaci jsme považovali tu, kterou navodí nitroprusid sodný (NTS) podaný na závěr pokusu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM z 9 měření (4-MC + ODQ) a z 8 měření (4-MC). Body byla proložena relaxační křivkou a spočítán konfidenční interval $CI_{95\%}$. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů. Křivky byly považovány za významně odlišné, pokud nedošlo k překryvu konfidenčních intervalů. Kroužky potkaní aorty v jedné skupině byly získány z nejméně čtyř různých zvířat.

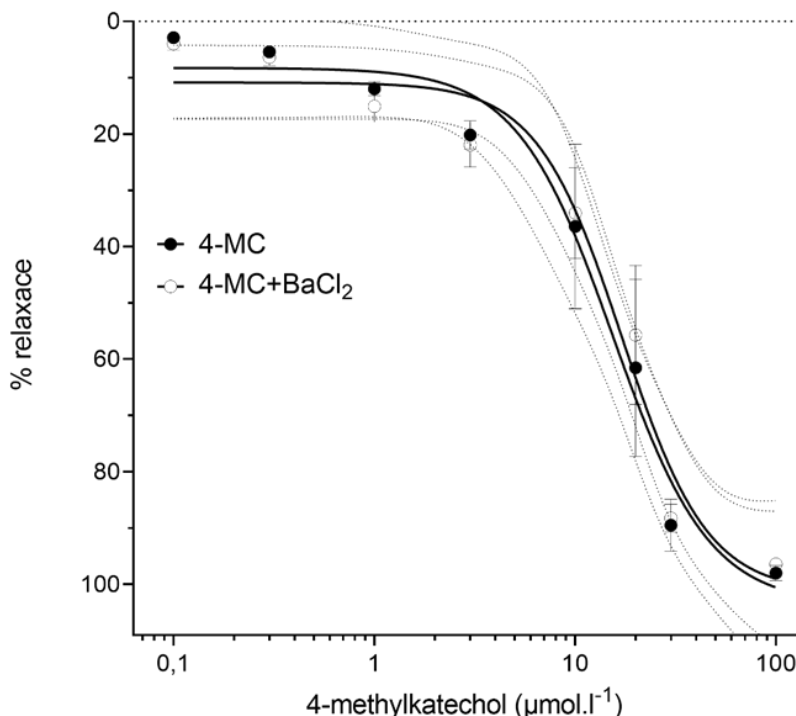
Protokol č. 6 – Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály BK_{Ca} na hladkém cévním svalu?



Graf 6. Vliv 4-methylkatecholu (4-MC) na draselné kanály BK_{Ca}.

Graf znázorňuje vasorelaxaci kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) navozenou kumulativním podáním 4-MC ($0,1 - 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kroužky byly 30 minut inkubovány se selektivním reversibilním inhibitorem BK_{Ca} kanálů, iberiotoxinem (100nmol.l^{-1}), nebo s rozpouštědlem. Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z maximální možné. Za maximální vasorelaxaci jsme považovali tu, kterou navodí nitroprusid sodný (NTS) podaný na závěr pokusu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM z 8 měření (4-MC) a ze 4 měření (4-MC + Ibx). Body byla proložena relaxační křivka a spočítán konfidenční interval CI_{95%}. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů. Křivky byly považovány za významně odlišné, pokud nedošlo k překryvu konfidenčních intervalů. Kroužky potkaní aorty v jedné skupině byly získány z nejméně čtyř různých zvířat.

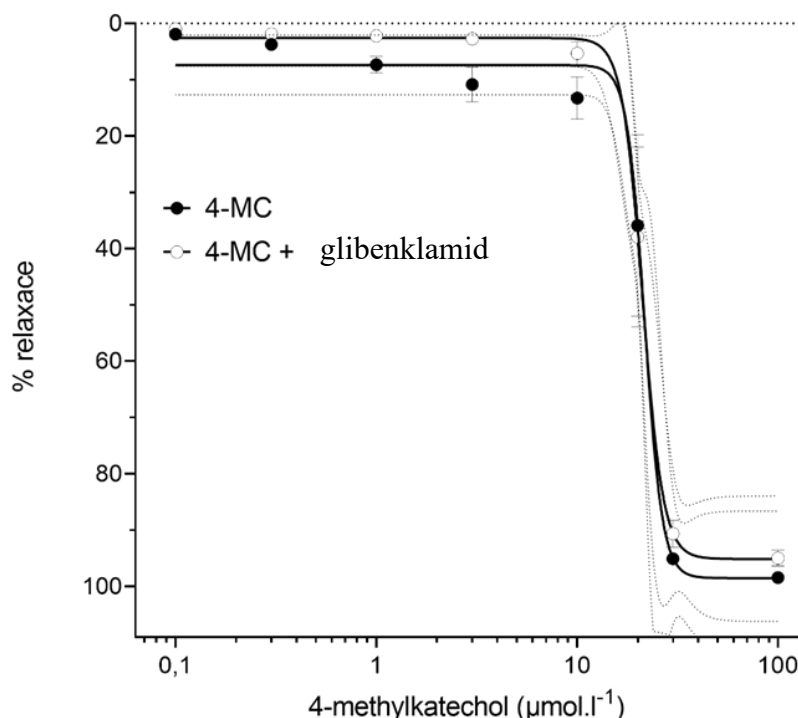
Protokol č. 7 – Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály K_{ir} na hladkém cévním svalu?



Graf 7. Vliv 4-methylkatecholu (4-MC) na draselné kanály K_{ir} .

Graf znázorňuje vasorelaxaci kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) navozenou kumulativním podáním 4-MC ($0,1 - 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kroužky byly 30 minut inkubovány s inhibítozem K_{ir} kanálů, BaCl_2 ($50 \mu\text{mol.l}^{-1}$), nebo s rozpouštědlem. Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z maximální možné. Za maximální vasorelaxaci jsme považovali tu, kterou navodí nitroprusid sodný (NTS) podaný na závěr pokusu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM z 5 měření (4-MC) a ze 4 měření (4-MC + BaCl_2). Body byla proložena relaxační křivka a spočítán konfidenční interval $\text{CI}_{95\%}$. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů. Křivky byly považovány za významně odlišné, pokud nedošlo k překryvu konfidenčních intervalů. Kroužky potkaní aorty v jedné skupině byly získány z nejméně čtyř různých zvířat.

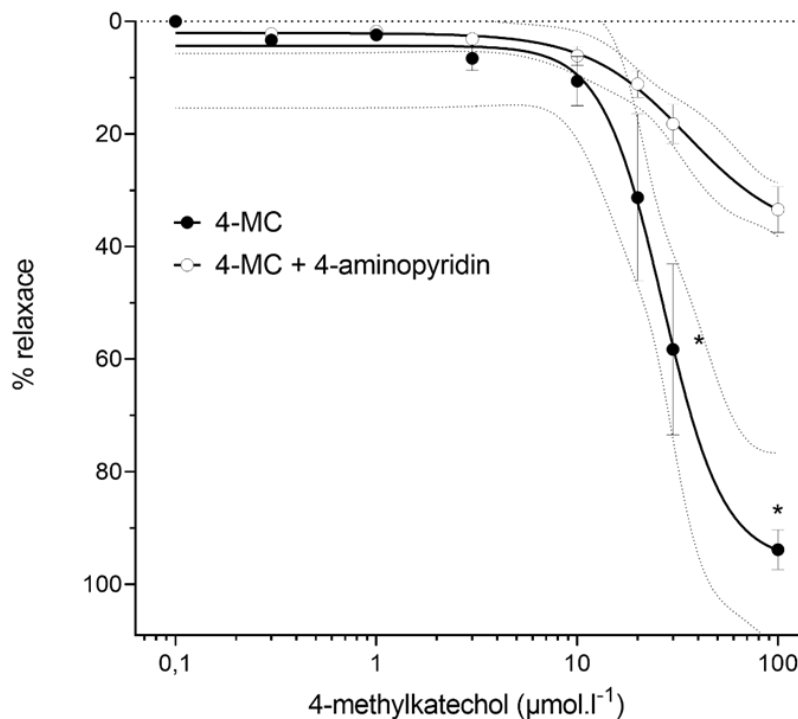
Protokol č. 8 – Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály K_{ATP} na hladkém cévním svalu?



Graf 8. Vliv 4-methylkatecholu (4-MC) na draselné kanály K_{ATP} .

Graf znázorňuje vasorelaxaci kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) navozenou kumulativním podáním 4-MC ($0,1 - 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kroužky byly 30 minut inkubovány s inhibítor K_{ATP} kanálů, glibenklamidem ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$), nebo s rozpouštědlem. Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z maximální možné. Za maximální vasorelaxaci jsme považovali tu, kterou navodí nitroprusid sodný (NTS) podaný na závěr pokusu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM z 5 měření (4-MC) a ze 6 měření (4-MC + glibenklamid). Body byla proložena relaxační křivka a spočítán konfidenční interval $CI_{95\%}$. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů. Křivky byly považovány za významně odlišné, pokud nedošlo k překryvu konfidenčních intervalů. Kroužky potkaní aorty v jedné skupině byly získány z nejméně čtyř různých zvířat.

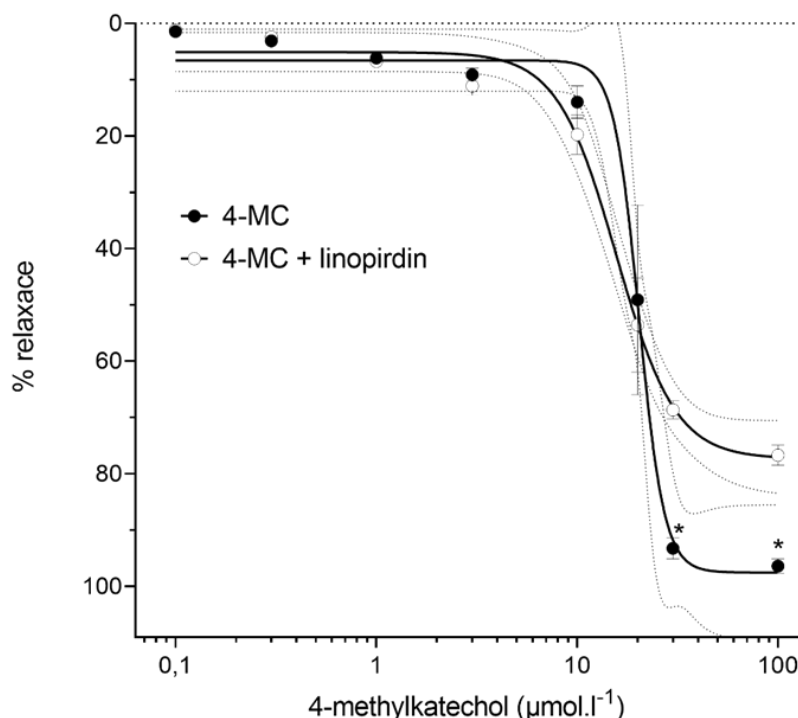
Protokol č. 9 – Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály K_V na hladkém cévním svalu?



Graf 9. Vliv 4-methylkatecholu (4-MC) na draselné kanály K_V .

Graf znázorňuje vasorelaxaci kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) navozenou kumulativním podáním 4-MC ($0,1 - 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kroužky byly 30 minut inkubovány s inhibítor K_V kanálů, 4-aminopyridinem (3 mmol.l^{-1}), nebo s rozpouštědlem. Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z maximální možné. Za maximální vasorelaxaci jsme považovali tu, kterou navodí nitroprusid sodný (NTS) podaný na závěr pokusu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ze 7 měření v obou skupinách (4-MC a 4-MC + 4-AP). Body byla proložena relaxační křivka a spočítán konfidenční interval CI_{95%}. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů. Křivky byly považovány za významně odlišné, pokud nedošlo k překryvu konfidenčních intervalů. Kroužky potkaní aorty v jedné skupině byly získány z nejméně čtyř různých zvířat. * $P \leq 0,05$

Protokol č. 10 – Účastní se vasodilatace navozené 4-MC draselné kanály K_{v7} na hladkém cévním svalu?



Graf 10. Vliv 4-methylkatecholu (4-MC) na draselné kanály K_{v7} .

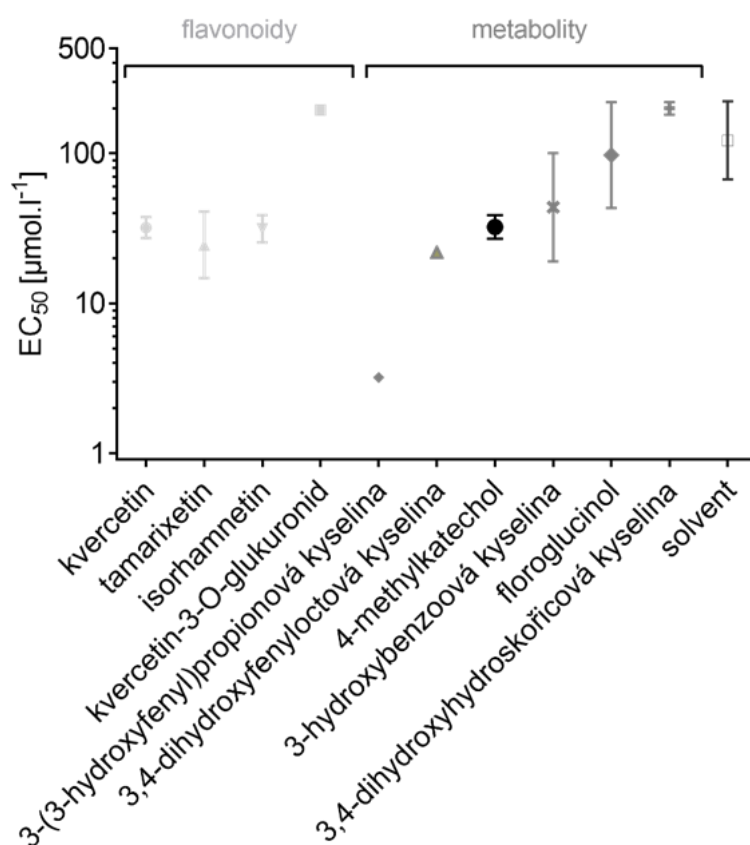
Graf znázorňuje vasorelaxaci kroužků izolované potkaní aorty *ex vivo* prekontrahovaných pomocí noradrenalinu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) navozenou kumulativním podáním 4-MC ($0,1 - 100 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Kroužky byly 30 minut inkubovány se selektivním inhibítorem K_{v7} kanálů, linopirdinem ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$), nebo s rozpouštědlem. Z cév byl před pokusem mechanicky odstraněn funkční endotel. Relaxace byla změřena izometricky a vyjádřena jako procento z maximální možné. Za maximální vasorelaxaci jsme považovali tu, kterou navodí nitroprusid sodný (NTS) podaný na závěr pokusu ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ze 6 měření (4-MC) a z 8 měření (4-MC + linopirdin). Byla položena relaxační křivka a spočítán konfidenční interval $CI_{95\%}$. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů. Křivky byly považovány za významně odlišné, pokud nedošlo k překryvu konfidenčních intervalů. Kroužky potkaní aorty v jedné skupině byly získány z nejméně čtyř různých zvířat. * $P \leq 0,05$

6. DISKUZE

Choroby kardiovaskulárního systému patří stále k velmi závažným problémům lidské populace. Incidence kardiovaskulárních onemocnění narůstá zejména vlivem různých rizikových faktorů, mezi něž můžeme zařadit genetické predispozice, životní styl, vysoký krevní tlak, diabetes mellitus, dyslipidémii, obezitu či kouření (Ciumărnean 2020). Vysoká incidence a závažné dopady kardiovaskulárních onemocnění jsou hlavními důvody pro neustálé hledání nových možností terapie (Klener et al. 2012, Štefja et al. 2007). V tomto směru je velká pozornost věnována mimo jiné také strukturám získávaným z přírodních zdrojů. Řada experimentálních prací potvrzuje přímou pozitivní souvislost mezi příjmem rostlinných flavonoidů ve stravě a snížením rizika kardiovaskulárních chorob – zejména co se týká vlivu na krevní tlak a správnou funkci cévního endotelu (Hügel et al. 2016).

Tato diplomová práce rozšiřuje výzkum kardioprotektivního působení flavonoidů na lidský organismus. Preventivní působení u kardiovaskulárních chorob vychází především z jejich antioxidační, antitrombogenní, antiaterogenní a také vasodilatační aktivity. Vasodilatační účinky flavonoidů se liší látka od látky. Některé flavonoidy potencují endotelovou vasodilataci např. potlačením syntézy vasokonstrikčních působků či inhibicí ACE systému (Hollman a Katan 1999, Hügel et al. 2016, Khan et al. 2021). Jiné látky potlačují vasokonstrikci způsobenou ET-1 či angiotensinem II (Kudo et al. 2021). Významná je také jejich schopnost plnit úlohu signálních molekul na základě vzájemné interakce s buněčnými receptory, kinázami a enzymy, čímž dokážou regulovat řadu signalizačních kaskád. Další mechanismy kardioprotektivního působení přírodních flavonoidů jsou stále předmětem výzkumu (Hügel et al. 2016, Kudo et al. 2021). I když tato problematika není zcela objasněna, obecně platí, že pro kardioprotektivní působení flavonoidů je důležitý jejich dostatečný a pravidelný příjem potravou. Flavonoidy přijímané v potravě mají překvapivě velmi nízkou biodostupnost a v plazmě dosahují nízkých koncentrací, což je v rozporu s jejich prokázanými pozitivními účinky. Vysvětlením by mohly být jejich metabolity vznikající činností lidského mikrobiomu, které jsou daleko lépe vstřebatelné (koncentrace v plazmě řádově v jednotkách $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a které by tak mohly být zodpovědné za terapeutické účinky (Hrubša et al. 2022).

V této diplomové práci jsme se zaměřili na jeden z kolonických metabolitů flavonoidů – 4-methylkatechol (4-MC). Volba látky nebyla náhodná, vycházeli jsme z předchozího *ex vivo* screeningu, ve kterém 4-MC patřil mezi účinné vasodilatační látky. Tento screening také ukázal, že některé kolonické metabolity vykazují *ex vivo* vasodilatační účinek srovnatelný nebo i vyšší než parentní flavonoidy.



Graf 11. Graf zobrazuje vasodilatační aktivitu vybraných flavonoidů a jejich metabolitů (včetně 4-methylkatecholu) *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované noradrenalinem (10 µmol.l⁻¹). Na horizontální ose grafu je výčet vybraných testovaných flavonoidů a metabolitů, vertikální osa zobrazuje odpovídající hodnotu EC₅₀. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM.

Zdroj: Pourová et al. (2018), upraveno

Cílem této práce bylo odhalit mechanismus vasodilatačního působení 4-MC. K tomuto účelu jsme zvolili metodu *ex vivo* izolovaných kroužků potkaní aorty. Jedná se

o klasickou farmakologickou metodu, která je v laboratoři Výzkumné skupiny kardiovaskulární a respirační farmakologie dobře zavedena. Záměrně jsme použili stejný zvířecí druh, jako byl použit ve screeningu. Z předpokusů jsme věděli, že vasodilatační efekt 4-MC je nezávislý na přítomnosti endotelu (Pourová et al. 2018). Z tohoto důvodu jsme se zaměřili přímo na hladký cévní sval a testování jednotlivých mechanismů účinků proto probíhalo na cévách s odstraněným funkčním endotelem za použití inhibitorů nebo aktivátorů jednotlivých mechanismů. Jako kontrolu jsme používali příslušné rozpouštědlo (DMSO v odpovídající koncentraci nebo Krebsův roztok).

Nejprve jsme ověřili, že 4-MC má ve zvoleném experimentálním modelu opravdu vasodilatační účinky. Následně jsme zjistili, že dokáže signifikantně potencovat vasodilatační aktivitu NTS (přímý donor NO). Na základě toho jsme se zaměřili na navazující signální dráhu *NO-sGC-cGMP-PKG*. Postupně jsme testovali, zda 4-MC inhibuje solubilní guanylátcyklázu nebo dva podtypy proteinkinázy G, ale ani jeden z těchto účinků jsme neprokázali.

Vrátili jsme se proto na začátek a zkusili jsme otestovat vliv 4-MC na vasodilataci navozenou forskolinem (aktivátor adenylátcyklázy a dráhy *AC-cAMP-PKA*). I v tomto případě jsme prokázali potenciaci vasodilatačního efektu. Protože 4-MC potencuje jak dráhu NO, tak dráhu cAMP, rozhodli jsme se otestovat vliv 4-MC na jejich společné cíle – membránové iontové kanály. Membránové kanály hrají velmi významnou roli v buněčné fyziologii. Jsou rozhodující pro dilataci nebo kontrakci hladkého cévního svalu, protože regulují přesun iontů (zejména draselných a sodných), a tak i polaritu buněčné membrány. Depolarizace se obecně pojí s vasokonstrikcí a repolarizace s vasodilatací. Kromě toho některé iontové kanály zprostředkovávají přísun extracelulárních vápenatých iontů, které jsou rozhodující pro zahájení svalové kontrakce.

Z membránových iontových kanálů jsme nejprve testovali, zda by 4-MC mohl být blokátorem vápníkových kanálů L-typu, které představují hlavní způsob vstupu iontů Ca^{2+} do buněk hladkého cévního svalu. K pokusu jsme využili aktivátor tohoto kanálu (BayK-8644) a jako pozitivní kontrolu jeho známý inhibitor (nifedipin). Výsledky

ukázaly, že 4-MC nedokáže zvrátit účinky BayK-8644 a nepůsobí tedy jako přímý inhibitor vápníkových kanálů L-typu.

Další možností účinku 4-MC bylo ovlivnění membránových draselných kanálů. Ze všech iontů, které se fyziologicky vyskytují v buňkách hladkého cévního svalu nebo extracelulárně v jejich okolí, je buněčná membrána nejvíce prostupná právě pro draselné ionty. Z tohoto důvodu mají draselné ionty největší vliv na regulaci membránového potenciálu. Vysoká prostupnost pro K^+ je z velké míry dána přítomností mnoha typů specifických iontových kanálů. Liší se od sebe umístěním, úlohou v jednotlivých fázích hladkosvalové fyziologie a způsobem řízení. Podle způsobu řízení rozpoznáváme tyto základní typy: draselné kanály řízené vápenatými ionty (BK_{Ca}), kanály řízené ATP (K_{ATP}), kanály usměrněné dovnitř (K_{ir}) a konečně kanály napětově řízené (K_v). Nicméně všechny tyto kanály specificky propouštějí ionty K^+ a aktivace kteréhokoliv typu vede k re/hyperpolarizaci a tím k vasodilataci.

V našich pokusech jsme vycházeli z předpokladu, že pokud 4-MC aktivuje některý z těchto kanálů, přítomnost specifického antagonisty vybraného kanálu zabrání vasodilatačnímu účinku. Touto metodou jsme postupně vyloučili, že by 4-MC aktivoval kanály BK_{Ca} , K_{ir} nebo K_{ATP} .

Naopak jsme zjistili, že 4-MC navozenou vasodilataci výrazně sníží blokáda K_v kanálů pomocí 4-aminopyridinu. Následně jsme za použití linopirdinu otestovali také kanály K_v7 (podtyp kanálů K_v , který je hojně zastoupen v cévním hladkém svalu). I zde jsme došli k pozitivnímu výsledku, i když účinek blokády byl méně výrazný. Z toho usuzujeme, že kanály K_v7 se na účinku 4-MC významně podílejí, ale ne exkluzivně. Kanály K_v citlivě reagují na depolarizaci buněčné membrány a v otevřeném stavu umožňují efflux draselných kationtů z buňky. V důsledku toho nastává repolarizace, membránový potenciál se stává více negativním, což uzavírá napětově řízené vápenaté kanály a tím i hlavní zdroj Ca^{2+} iontů pro svalovou kontrakci (Byron, Brueggemann 2018). Výsledkem je proto vasodilatace.

Použitá metoda izolované cévy *ex vivo* je jednoduchá a spolehlivá, ale má své limity. Při určování mechanismu účinku umožňuje postupovat vylučovací metodou. Z našich výsledků jasně vyplývá, že vasodilatace navozená 4-MC je spojená s aktivitou napětově řízených K_v kanálů na plazmatické membráně buněk cévního hladkého

svalu. Nicméně přesný průběh nevíme. 4-MC může aktivaci K_v kanálů způsobovat přímo anebo zprostředkovaně pomocí dalších struktur, které tyto kanály aktivují. Již byl vyloučen přímý vliv na sGC a PKG, nicméně existují i další možnosti. Nebyl otestován např. vliv na inhibitory fosfodiesteráz nebo na nitrobuněčné zásoby vápenatých iontů. Konkrétní mechanismus vasodilatačního účinku 4-MC se nám tedy zatím podařilo pouze poodhalit a je potřeba provést další upřesňující pokusy. Kromě toho jsou do budoucna plánovány obdobné pokusy na izolované prasečí koronární cévě *ex vivo*. Je známo, že koronární cévy se liší od ostatních a mohou reagovat jinak než ostatní periferní artérie. K výhodě tohoto modelu patří fakt, že lidské a prasečí koronární cévy si jsou velmi podobné.

Na závěr bych chtěla poznamenat, že tato diplomová práce je součástí širšího výzkumu Výzkumné skupiny kardiovaskulární a respirační farmakologie a kardiovaskulární účinky 4-MC již byly ověřeny i jinak. Nejpřesvědčivější důkaz přinesly *in vivo* pokusy na hypertenzních potkanech, kde 4-MC významně snižoval krevní tlak po bolusovém i infuzním podání.

7. ZÁVĚR

Tato diplomová práce testovala pomocí *ex vivo* experimentů na izolované potkaní aortě mechanismus vasodilatačního účinku významného kolonického metabolitu flavonoidů – 4-methylkatecholu.

Z našich pokusů vyplývají tyto závěry:

- 4-methylkatechol signifikantně potencuje vasodilatační účinky nitroprusidu sodného (donor NO) a forskolinu (aktivátor adenylátcyklázy)
- vasodilatační efekt 4-methylkatecholu je závislý na aktivitě K_v kanálů na hladkém cévním svalu
- podstatnou, ale ne výlučnou roli hraje podtyp K_v7 , který je v periferních cévách hojně zastoupen
- nebyl prokázán přímý vliv 4-methylkatecholu na další hladkosvalové draselné kanály – kanály aktivované vápníkem (BK_{Ca}), kanály řízené ATP (K_{ATP}) a kanály usměrněné dovnitř (K_{ir})
- nebyl prokázán přímý vliv 4-methylkatecholu na hladkosvalové vápníkové kanály L-typu
- nebylo prokázáno, že by 4-methylkatechol přímo aktivoval solubilní guanylátcyklázu nebo proteinkinázu G

8. LITERATURA

- 1) Abbas M et al. *Natural polyphenols: An overview, International Journal of Food Properties*, 2017, 20: 8, 1689-1699. DOI: 10.1080/10942912.2016.1220393.
- 2) Abbaszadeh-Goudarzi et al. *Evaluating effect of alginate/chitosan hydrogel containing 4-Methylcatechol on peripheral nerve regeneration in rat model*. International journal of polymeric materials. OSLO: Taylor & Francis, 2021, 70 (17), 1248-1257. DOI: 10.1080/00914037.2020.1785462.
- 3) Agrawal AD. *Pharmacological Activities of Flavonoids: A Review*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology (IJPSN), 2011, 4 (2), 1394-1398. Available from: <https://doi.org/10.37285/ijpsn.2011.4.2.3>.
- 4) Andersen ØM, Markham KR. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006: 149, 219-220. ISBN 978-0-8493-2021-7.
- 5) Andrea JE, Walsh MP. *Protein kinase C of smooth muscle*. Hypertension. 1992 Nov; 20 (5): 585-95. DOI: 10.1161/01.hyp.20.5.585.
- 6) Applová L, Karličková J, Warncke P, Macáková K, Hrubša M, Macháček M, Tvrđý V, Fischer D, Mladěnka P. *4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects*. Mol Nutr Food Res, 2019. Aug 7; 63 (20): e1900261. DOI: 10.1002/mnfr.201900261.
- 7) Balko J, Tonar Z, Varga I. *Memorix histologie*. Praha: Triton, 2016: 65. ISBN 978-80-7553-009-7.
- 8) Batiha GE et al. *The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin*. Foods. 2020 Mar 23; 9 (3): 374. DOI: 10.3390/foods9030374.
- 9) Biel V, Novák J, Pluháček L, Špác J. *Funkce endotelu, její vztah k arteriální hypertenzi a možnosti její modulace*. Vnitřní lékařství, 2018. Vol. 64 (7-8): 762-770. DOI: 10.36290/vnl.2018.104.
- 10) Blair NT et al. *Transient Receptor Potential channels (TRP) in GtoPdb v.2022.1*. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2022; 2022 (1). Available from: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F78/2022.1>.
- 11) Bonaventura D, Lunardi CN, Rodrigues GJ, Neto MA, Bendhack LM. *A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta*. Nitric Oxide. 2008 Jun; 18 (4): 287-95. DOI: 10.1016/j.niox.2008.02.004. Epub 2008 Mar 10.
- 12) Bosnjak ZJ. *Ion channels in vascular smooth muscle. Physiology and pharmacology*. Anesthesiology. 1993 Dec; 79 (6): 1392-401. DOI: 10.1097/00000542-199312000-00031.
- 13) Braune S, Küpper JH, Jung F. *Effect of Prostanoids on Human Platelet Function: An Overview*. Int J Mol Sci. 2020 Nov 27; 21 (23): 9020. DOI: 10.3390/ijms21239020.

- 14) Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, Gao YZ, Aggarwal M, Morgan KG. *Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders*. *Pharmacol Rev.* 2016 Apr; 68 (2): 476-532. DOI: 10.1124/pr.115.010652.
- 15) Byron KL, Brueggemann LI. *Kv7 potassium channels as signal transduction intermediates in the control of microvascular tone*. *Microcirculation.* 2018 Jan; 25 (1). DOI: 10.1111/micc.12419.
- 16) Carafoli E, Krebs J. *Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator*. *J Biol Chem.* 2016 Sep 30; 291 (40): 20849-20857. DOI: 10.1074/jbc.R116.735894. Epub 2016 Jul 26.
- 17) Cassidy A, Minihane AM. *The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids*. *Am J Clin Nutr.* 2017 Jan; 105 (1): 10-22. DOI: 10.3945/ajcn.116.136051. Epub 2016 Nov 23.
- 18) Ciumărnean L et al. *The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases*. *Molecules.* 2020 Sep 21; 25 (18): 4320. DOI: 10.3390/molecules25184320.
- 19) Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. *Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds*. *Mol Aspects Med.* 2010 Dec; 31 (6): 446-67. DOI: 10.1016/j.mam.2010.09.007. Epub 2010 Sep 18.
- 20) Čertík B, Machart S, Novák M. *Onemocnění karotid a velkých cév aortálního oblouku*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005: 40. ISBN 80-247-1268-7.
- 21) Čihák R. *Anatomie 3*. 3. upravené a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2016: 3, 53-54, 431, 697. ISBN 978-80-247-5636-3.
- 22) Davenport AP et al. *Endothelin*. *Pharmacol Rev.* 2016 Apr; 68 (2): 357-418. DOI: 10.1124/pr.115.011833.
- 23) Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. *Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability*. *Nutrients.* 2021 Jan 19; 13 (1): 273. DOI: 10.3390/nu13010273.
- 24) Dixon RE, Navedo MF, Binder MD, Santana LF. *Mechanisms and physiological implications of cooperative gating of clustered ion channels*. *Physiol Rev.* 2022 Jul 1; 102 (3): 1159-1210. DOI: 10.1152/physrev.00022.2021. Epub 2021 Dec 20.
- 25) Doležal M. et al. *Farmaceutická chemie léčiv působících na kardiovaskulární, trávicí a vylučovací systém*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2022: 12, 36, 39. ISBN 978-80-246-5102-6.
- 26) Dopico AM, Bukiya AN, Jaggar JH. *Calcium- and voltage-gated BK channels in vascular smooth muscle*. *Pflugers Arch.* 2018 Sep; 470 (9): 1271-1289. DOI: 10.1007/s00424-018-2151-y. Epub 2018 May 11.
- 27) Dylevský I. *Somatologie: pro předmět Základy anatomie a fyziologie člověka*. 3. přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2019: 37, 109-110, 276-277. ISBN 978-80-271-2111-3.

- 28) Erdman JW. *Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop*. The Journal of nutrition, 2007, Vol. 137 (3), p.718s-737s.
- 29) Feng X et al. *Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites*. Drug Metabolism Reviews, 2018. 50: 3, 343-356, DOI: 10.1080/03602532.2018.1485691.
- 30) Ferreyra MLF, Rius SP, Casati P. *Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications*. Front Plant Sci 2012; 3: 222.
- 31) Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action*. Pharmacol Rev. 2010 Sep; 62 (3): 525-63. DOI: 10.1124/pr.110.002907.
- 32) Fukuhara K et al. *Intracerebroventricular 4-Methylcatechol (4-MC) Ameliorates Chronic Pain Associated with Depression-Like Behavior via Induction of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)*. Cell Mol Neurobiol 32, 971–977 (2012). DOI: 10.1007/s10571-011-9782-2. Epub 2011 Dec 25.
- 33) Gao Y. *Biology of Vascular Smooth Muscle: Vasoconstriction and Dilatation*. 1st ed. Singapore: Springer. 2017: 18-19, 42, 45, 48, 88, 90, 101-102, 106, 131, 139-140, 146, 161, 163, 169-170, 173-174, 181-182, 187, 189. ISBN 978-981-10-4809-8.
- 34) Gasser T. *Aorta*. 10.1016/B978-0-12-804009-6.00008-0. In: Biomechanics of Living Organs: Hyperelastic Constitutive Laws for Finite Element Modeling, Elsevier, 2017, p. 169-191.
- 35) Gonzales RJ, Carter RW, Kanagy NL. *Laboratory demonstration of vascular smooth muscle function using rat aortic ring segments*. Adv Physiol Educ. 2000 Dec; 24 (1): 13-21. DOI: 10.1152/advances.2000.24.1.13.
- 36) Goszcz K, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. *Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response?* Br J Pharmacol. 2017 Jun; 174 (11): 1209-1225. DOI: 10.1111/bph.13708. Epub 2017 Feb 2.
- 37) Grim M, Naňka O, Helekal I. *Atlas anatomie člověka II*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2017: 104. ISBN 978-80-247-4156-7.
- 38) Gross M. *Flavonoids and Cardiovascular Disease, Pharmaceutical Biology*, 2004, 42: sup1, 21-35, DOI: 10.3109/13880200490893483.
- 39) Guo Y et al. *Forming 4-Methylcatechol as the Dominant Bioavailable Metabolite of Intraruminal Rutin Inhibits p-Cresol Production in Dairy Cows. Metabolites*. 2021 Dec 24; 12 (1): 16. DOI: 10.3390/metabo12010016.
- 40) Gurney AM, Clapp LH. *Advances in Molecular and Cell Biology*. Elsevier. 1994, Vol. 8: p. 21-41 (Calcium Channels and Vasodilation). ISBN 9781559386364.
- 41) Hanaoka Y, Ohi T, Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K, Matsukura S. *The therapeutic effects of 4-methylcatechol, a stimulator of endogenous nerve growth factor synthesis, on experimental diabetic neuropathy in rats*. J Neurol Sci. 1994 Mar; 122 (1): 28-32. DOI: 10.1016/0022-510x(94)90048-5.

- 42) Harborne JB. *The Flavonoids: Advances in research since 1986*. 1st ed. New York: Routledge, 1994: 500. ISBN 0-412-48070-0.
- 43) Herrera MD, Zarzuelo A, Jiménez J, Marhuenda E, Duarte J. *Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships*. Gen Pharmacol. 1996 Mar; 27 (2): 273-7. DOI: 10.1016/0306-3623(95)02010-1.
- 44) Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. *Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles*. Physiol Rev. 2010 Jan; 90 (1): 291-366. DOI: 10.1152/physrev.00021.2009.
- 45) Hollman PC. *Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids*. Pharmaceutical Biology, 2004, 42: sup1, 74-83, DOI: 10.3109/13880200490893492.
- 46) Hollman PC, Katan MB. *Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability*. Food Chem Toxicol. 1999 Sep-Oct; 37 (9-10): 937-42. DOI: 10.1016/s0278-6915(99)00079-4.
- 47) Holzerová K. *Úloha proteinkinasy C a jejích cílových proteinů v mechanismu kardioprotekce*. Dizertační práce, Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta, 2016: 18-19.
- 48) Hrubša M et al. *The Antiplatelet Effect of 4-Methylcatechol in a Real Population Sample and Determination of the Mechanism of Action*. Nutrients 2022, 14, 4798. <https://doi.org/10.3390/nu14224798>.
- 49) Hügel HM, Jackson N, May B, Zhang AL, Xue CC. *Polyphenol protection and treatment of hypertension*. Phytomedicine. 2016 Feb 15; 23 (2): 220-31. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.12.012. Epub 2016 Jan 7.
- 50) Cheng J, Wen J, Wang N, Wang C, Xu Q, Yang Y. *Ion Channels and Vascular Diseases*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2019 May; 39 (5): e146-e156. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.312004.
- 51) Jucá MM et al. *Flavonoids: biological activities and therapeutic potential, Natural Product Research*, 2020, 34: 5, 692-705, DOI: 10.1080/14786419.2018.1493588.
- 52) Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Základy histologie*. 7. vyd. Jinočany: H & H, 1997: 197, 200-201, 233, 365-366, 378. ISBN 80-85787-37-7.
- 53) Kachlík D. *Anatomie pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2018: 82-83, 115, 124. ISBN 978-80-246-4058-7.
- 54) Karásek D, Vavřková H. *Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi*. Interní medicína pro praxi. Březsko: Solen 2004, 9: 450-453.
- 55) Karatug Kacar A, Gezginici-Oktayoglu S, Bolkent S. *4-Methylcatechol stimulates apoptosis and reduces insulin secretion by decreasing betacellulin and inhibin beta-A in INS-1 beta-cells*. Hum Exp Toxicol. 2018 Nov; 37 (11): 1123-1130. DOI: 10.1177/0960327118758365. Epub 2018 Feb 23.

- 56) Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*. 14th ed. New York: The McGraw-Hill Education, 2018: 33-34, 93, 98-99, 110, 137-140, 174-175, 259, 285-286, 306, 311-312, 323, 327, 329, 339, 341-343. ISBN 978-1-259-64115-2.
- 57) Kawabata K, Yoshioka Y, Terao J. *Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols*. *Molecules*. 2019 Jan 21; 24 (2): 370. DOI: 10.3390/molecules24020370.
- 58) Keith Wan Kee NG A. *Vascular Function and Structure in the Rat Aorta*. Cambridge: Cambridge Scholars Publishing, 2013: 84. ISBN 9781443848237.
- 59) Khan J et al. *Dietary Flavonoids: Cardioprotective Potential with Antioxidant Effects and Their Pharmacokinetic, Toxicological and Therapeutic Concerns*. *Molecules*. 2021 Jun 30; 26 (13): 4021. DOI: 10.3390/molecules26134021.
- 60) Kittnar O et al. *Přehled lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2021: 17-19, 47-49, 62-64, 85. ISBN 978-80-271-1025-4.
- 61) Kittnar O, Mlček M. *Atlas fyziologických regulací: 329 schémat*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009: 87, 91-92. ISBN 978-80-247-2722-6.
- 62) a Klabunde RE. *Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation*. In: *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2019. Dostupné na URL: <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP026>. Přístup: 9. 10. 2022.
- b Klabunde RE. *Coronary Artery Disease*. In: *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2019. Dostupné na URL: <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP026>. Přístup: 9. 10. 2022.
- 63) Klener P et al. *Vnitřní lékařství*. 4. přepracované a doplněné vyd. Praha: Galén a Karolinum, 2012: 33, 175, 180, 205, 212, 237, 248, 250, 257, 262, 264, 894. ISBN 978-80-7262-857-5.
- 64) Knox M, Vinet R, Fuentes L, Morales B, Martínez JL. *A Review of Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilation Induced by Phytochemicals in Isolated Rat Aorta*. *Animals (Basel)*. 2019 Aug 29; 9 (9): 623. DOI: 10.3390/ani9090623.
- 65) Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. *Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells*. *J Smooth Muscle Res*. 2008 Apr; 44 (2): 65-81. DOI: 10.1540/jsmr.44.65.
- 66) Konrádová V, Uhlík J, Vajner L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H & H, 2000: 84-87, 97. ISBN 80-86022-80-3.
- 67) Kudo R, Yuui K, Kasuda S. *Endothelium-Independent Relaxation of Vascular Smooth Muscle Induced by Persimmon-Derived Polyphenol Phytocomplex in Rats*. *Nutrients*. 2021 Dec 26; 14 (1): 89. DOI: 10.3390/nu14010089.
- 68) Kumar S, Pandey AK. *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. *ScientificWorldJournal*. 2013 Dec 29; 2013: 162750. DOI: 10.1155/2013/162750.
- 69) Langmeier M. et al. *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009: 55-57, 79, 83, 122, 265-267. ISBN 978-80-247-2526-0.

- 70) Larson AJ, Symons JD, Jalili T. *Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms*. Adv Nutr. 2012 Jan; 3 (1): 39-46. DOI: 10.3945/an.111.001271. Epub 2012 Jan 5.
- 71) a Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. *Biochemie pro studující medicíny – I. díl*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009: 28, 65, 206-207. ISBN 9788024614168.
- b Ledvina M, Stoklasová A, Cerman J. *Biochemie pro studující medicíny – II. díl*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2009: 392-394. ISBN 9788024614151.
- 72) Levitan I, Dopico AM. *Vascular Ion Channels in Physiology and Disease*. 1st ed. Cham: Springer International Publishing, 2016: 4, 7, 102, 169. ISBN 9783319296333.
- 73) Liu XM et al. *Dietary total flavonoids intake and risk of mortality from all causes and cardiovascular disease in the general population: A systematic review and meta-analysis of cohort studies*. Mol Nutr Food Res, 2017. 61 (6).
- 74) Lukáš K, Žák A. *Chorobné znaky a příznaky: 76 vybraných znaků, příznaků a některých důležitých laboratorních ukazatelů v 62 kapitolách s prologem a epilogem*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010: 165. ISBN 978-80-247-2764-6.
- 75) Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. *Farmakologie a toxikologie*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004: 83-84, 86, 98, 103-104, 133, 138. ISBN 80-247-0836-1.
- 76) Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012: 21. ISBN 978-80-247-3729-4.
- 77) Maaliki D, Shaito AA, Pintus G, El-Yazbi A, Eid AH. *Flavonoids in hypertension: a brief review of the underlying mechanisms*. Curr Opin Pharmacol. 2019 Apr; 45: 57-65. DOI: 10.1016/j.coph.2019.04.014. Epub 2019 May 16.
- 78) Mannen R, Yasuda MT, Sano A, Goda T, Shimoi K, Ichikawa Y. *Changes in plasma concentration of flavonoids after ingestion of a flavonoid-rich meal prepared with basic foodstuffs*. Functional Foods in Health and Disease 2019; 9 (9): 446-465.
- 79) Martínková J et al. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007: 98-99, 107, 109, 183, 224. ISBN 978-80-247-1356-4.
- 80) Marunaka Y et al. *Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure*. Molecules. 2017 Jan 29; 22 (2): 209. DOI: 10.3390/molecules22020209.
- 81) Miller AJ, Arnold AC. *The renin-angiotensin system in cardiovascular autonomic control: recent developments and clinical implications*. Clin Auton Res. 2019 Apr; 29 (2): 231-243. DOI: 10.1007/s10286-018-0572-5. Epub 2018 Nov 9.
- 82) Mishra SK et al. *Endothelium-dependent relaxation of rat aorta and main pulmonary artery by the phytoestrogens genistein and daidzein*, Cardiovascular Research, Volume 46, Issue 3, June 2000, Pages 539–546, Available from: [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00049-3).

- 83) Mladěnka P, *Pharmacology of vascular system – drugs affecting vascular smooth muscles*. 2018. [online] Dostupné z: <<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/>> [cit. 20. 6. 2022]
- 84) Mourek J. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012: 35, 48, 118. ISBN 978-80-247-3918-2.
- 85) Murota K, Nakamura Y, Uehara M. *Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018. 82: 4, 600-610, DOI: 10.1080/09168451.2018.1444467.
- 86) Nachtigal P. *Fyziologie kardiovaskulárního systému*. 2020. [online] Dostupné z: <<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/>> [cit. 30. 10. 2022]
- 87) Najmanová I. *Vliv polyfenolických látek na hladký cévní sval*. Hradec Králové, 2018. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie. Vedoucí práce Mladěnka, Přemysl.
- 88) Najmanová I, Pourová J, Vopršalová M, Pilařová V, Semecký V, Nováková L, Mladěnka P. *Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats*. Mol Nutr Food Res. 2016 May; 60 (5): 981-91.
- 89) Nováková M. *Vlastnosti a regulace muskarinových a adrenergických receptorů*. Podtitul: *Působení stresu na vlastnosti muskarinových a adrenergických receptorů v plicích a srdci*. Praha, 2011: 15. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Fyziologický ústav 1. LF UK. Vedoucí práce Mysliveček, Jaromír.
- 90) Oak MH, Auger C, Belcastro E, Park SH, Lee HH, Schini-Kerth VB. *Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium*. Free Radic Biol Med. 2018 Jul; 122: 161-170. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.018. Epub 2018 Mar 13.
- 91) Palacios J et al. *Effect of phenylephrine and endothelium on vasomotion in rat aorta involves potassium uptake*. J Physiol Sci 63, 103–111 (2013). <https://doi.org/10.1007/s12576-012-0240-9>.
- 92) Payton F, Bose R, Alworth WL, Kumar AP, Ghosh R. *4-Methylcatechol-induced oxidative stress induces intrinsic apoptotic pathway in metastatic melanoma cells*. Biochem Pharmacol. 2011 May 15; 81 (10): 1211-8. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.03.005. Epub 2011 Mar 23.
- 93) Pérez-Vizcaíno F et al. *Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries*. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Jul; 302 (1): 66-72. DOI: 10.1124/jpet.302.1.66.
- 94) Petřek J. *Základy fyziologie člověka pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2019: 43, 52, 133, 135-136. ISBN 978-80-271-2208-0.
- 95) Pourová J, Najmanová I, Vopršalová M, Migkos T, Pilařová V, Applová L, Nováková L, Mladěnka P. *Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, Relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo*. Vascular Pharmacology 2018; 111: 36-43.

- 96) Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. *Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease*. Pharmacol Res. 2013 Feb; 68 (1): 125-31. DOI: 10.1016/j.phrs.2012.10.018. Epub 2012 Nov 19.
- 97) Ramanlal R, Gupta V. *Physiology, Vasodilation*. [Updated 2022 Jan 25]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557562/>.
- 98) Rameshrad M, Babaei H, Azarmi Y, Fouladi DF. *Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies*. Life Sci. 2016 Jan 15; 145: 190-204. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.12.043. Epub 2015 Dec 28.
- 99) Rana AC, Gulliya B. *Chemistry and Pharmacology of Flavonoids – A Review*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2019 Jan; 53 (1): 8-20.
- 100) Ringvold HC, Khalil RA. *Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders*. Adv Pharmacol. 2017; 78: 203-301. DOI: 10.1016/bs.apha.2016.06.002. Epub 2016 Jul 18.
- 101) Rokyta R et al. *Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech*. Praha: ISV nakladatelství, 2000: 31, 35, 43-45, 47, 65, 197, 205, 207, 237, 249. ISBN 80-85866-45-5.
- 102) Seccia TM, Rigato M, Ravarotto V, Calò LA. *ROCK (RhoA/Rho Kinase) in Cardiovascular-Renal Pathophysiology: A Review of New Advancements*. J Clin Med. 2020 May 2; 9 (5): 1328. DOI: 10.3390/jcm9051328.
- 103) Setchell KD and C. Clerici, *Equol: history, chemistry, and formation*. J Nutr, 2010. 140 (7): p. 1355s-62s.
- 104) Shier D, Butler J, Lewis R. *Hole's Human Anatomy & Physiology*. 14th ed. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2016: 23, 96, 307-308, 418, 511, 576. ISBN 978-0-07-802429-0.
- 105) Shimokawa H, Sunamura S, Satoh K. *RhoA/Rho-Kinase in the Cardiovascular System*. Circ Res. 2016 Jan 22; 118 (2): 352-66. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306532.
- 106) Schleifenbaum J et al. *Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries*. Circ Res 115: 263-272, 2014. DOI: 10.1161/circresaha.115.302882.
- 107) Schramm A, Mueller-Thuemen P, Littmann T, Harloff M, Ozawa T, Schlossmann J. *Establishing a Split Luciferase Assay for Proteinkinase G (PKG) Interaction Studies*. Int J Mol Sci. 2018 Apr 12; 19 (4): 180. DOI: 10.3390/ijms19041180.
- 108) Silbernagl S, Lang F. *Atlas patofyziologie člověka*. 1. vyd. české. Praha: Grada Publishing, a.s., 2001: 216-217, 260, 296. ISBN 80-7169-968-3.
- 109) Song S, Ayon RJ, Yuan JX. *Ryanodine receptor-2: a necessity for gating store-operated Ca²⁺ channels*. Cardiovasc Res. 2016 Jul 1; 111 (1): 13-5. DOI: 10.1093/cvr/cvw108. Epub 2016 May 26.

- 110) Souček M, Svačina P. et al. *Vnitřní lékařství v kostce*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2019: 109, 113, 152. ISBN 978-80-271-2289-9.
- 111) Spencer JPE, Crozier A. *Flavonoids and related compounds: bioavailability and functions*. New York: Boca Raton; London – CRC Press. 2012: 203, 299, 312, 322. ISBN 978-1-4398-4827-2.
- 112) Spilková J. et al. *Farmakognozie*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2016: 102-103. ISBN 978-80-246-3264-3.
- 113) Stromsnes K, Lagzdina R, Olaso-Gonzalez G, Gimeno-Mallench L, Gambini J. *Pharmacological Properties of Polyphenols: Bioavailability, Mechanisms of Action, and Biological Effects in In Vitro Studies, Animal Models, and Humans*. Biomedicines. 2021 Aug 23; 9 (8): 1074. DOI: 10.3390/biomedicines9081074.
- 114) Štejfka M. et al. *Kardiologie*. 3. přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007: 3, 38-40, 45, 47, 50, 52, 54, 213. ISBN 978-80-247-1385-4.
- 115) Šumpelová K. *Účinek kvercetinu a jeho vybraných metabolitů na izolovaných aortálních kroužcích potkana*. Hradec Králové, 2017. Rigorózní práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmakologie a toxikologie. Vedoucí práce Vopršalová, Marie.
- 116) Taylor CW, Tovey SC, Rossi AM, Lopez Sanjurjo CI, Prole DL, Rahman T. *Structural organization of signalling to and from IP3 receptors*. Biochem Soc Trans. 2014 Feb; 42 (1): 63-70. DOI: 10.1042/BST20130205.
- 117) Trojan S et al. *Lékařská fyziologie*. 4. přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003: 37-38, 52, 104, 107-108, 141, 151, 180, 196-199, 201, 208-210, 411, 453-455, 491-493, 573, 649-650, 652, 655. ISBN 80-247-0512-5.
- 118) Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. *Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles*. Compr Physiol, 2017. Mar 16; 7 (2): 485-581. DOI: 10.1002/cphy.c160011.
- 119) Ullah A et al. *Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent*. Molecules. 2020 Nov 11; 25 (22): 5243. DOI: 10.3390/molecules25225243.
- 120) Vajner L, Uhlík J, Novotný T, Konrádová V. *Lékařská histologie II.: mikroskopická anatomie*. 2., upravené vyd. Praha: Karolinum, 2017: 6-8, 10-11, 129-130, 1. ISBN 978-80-246-3827-0.
- 121) Veizerová L, Světlík J, Kettmann V. *Napětovo řízené vápníkové kanály: struktúra, charakteristika a terminolória*. 2007. Česká a slovenská farmacie, 56, 178-182.
- 122) Vítovec J, Špinar J, Špinarová J. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*. 3., zcela přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2017: 1-2. ISBN 978-80-247-4713-2.
- 123) Vlček J, Fialová D, Vytršalová M. *Klinická farmacie I.1.vyd.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2010: 73, 75, 108, 110. ISBN 978-80-247-3169-8.

- 124) Vokurka M. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 4. upravené vyd. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum, 2018: 168, 187, 253. ISBN 978-80-246-3563-7.
- 125) Wang G et al. *Pharmacological Activity of Quercetin: An Updated Review*. Evid Based Complement Alternat Med. 2022 Dec 1; 2022: 3997190. DOI: 10.1155/2022/3997190.
- 126) Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*. 2nd ed. Academic Press, 2018: 209, 221-235. ISBN 978-0-12-813006-3.
- 127) Yamagata K, Tagami M, Yamori Y. *Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease*. Nutrition. 2015 Jan; 31 (1): 28-37. DOI: 10.1016/j.nut.2014.04.011. Epub 2014 Apr 30.
- 128) Yung LM et al. *Tea polyphenols benefit vascular function*. Inflammopharmacology. 2008 Oct; 16 (5): 230-4. DOI: 10.1007/s10787-008-8022-y.
- 129) Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. *The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential*. Pharmacol Rev. 2015 Oct; 67 (4): 821-70. DOI: 10.1124/pr.114.009654.
- 130) Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. *Vascular nitric oxide: Beyond eNOS*. J Pharmacol Sci. 2015 Oct; 129 (2): 83-94. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.09.002. Epub 2015 Sep 28.
- 131) Zhu L, Zhang Y, Guo Z, Wang M. *Cardiovascular Biology of Prostanoids and Drug Discovery*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020 Jun; 40 (6): 1454-1463. DOI: 10.1161/ATVBAHA.119.313234. Epub 2020 Apr 16.

9. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Struktura cévní stěny.....	14
Obrázek 2 - Lidská aorta - jednotlivé části a větvení	15
Obrázek 3 - Schéma kontrakce hladkého cévního svalu	19
Obrázek 4 - Schéma vazokonstrikční aktivity vápenatých kationtů	20
Obrázek 5 - Vasodilatační aktivita oxidu dusnatého	26
Obrázek 6 - Schéma RAS systému a jeho regulační mechanismus.....	32
Obrázek 7 - Základní struktura flavonoidů (s vyznačením kruhů A-C a očíslovanými pozicemi)	47
Obrázek 8 - Metabolismus kvercetinu	53
Obrázek 9 - Metabolismus rutinu	54
Obrázek 10 - Chemická struktura 4-methylcatecholu (4-methylbenzen-1,2-diol)....	55
Obrázek 11 - Aparatura na izolovanou tkáň - Multi chamber tissue bath system	58
Obrázek 12 - Schéma pokusu, který ověřuje schopnost 4-MC potencovat vasodilatační účinky NO.....	65
Obrázek 13 - Schéma pokusu, který ověřuje schopnost 4-MC potencovat vasodilatační účinky po aktivaci dráhy cAMP	66
Obrázek 14 - Schéma pokusu, který ověřuje, zda je vasodilatace navozená 4-MC zprostředkována aktivací proteinkinázy G	66
Obrázek 15 - Schéma pokusu, který ověřuje schopnost 4-MC blokovat vápníkové kanály L-typu.....	67
Obrázek 16 - Schéma popisující ověření mechanismů pokusů 5-10	69

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Adrenergí receptory – typy, výskyt, výsledek aktivace	35
Tabulka 2 - Muskarinové receptory – typy, výskyt, výsledek aktivace	36
Tabulka 3 - Koncentrace nejdůležitějších iontů pro vasokonstrikci a vasodilataci v intracelulárním a extracelulárním prostředí	39
Tabulka 4 - Typy flavonoidů – chemické struktury a přehled zástupců.....	47
Tabulka 5 - Další účinky flavonoidů	50
Tabulka 6 - Složení Krebsova roztoku	59
Tabulka 7 - Použitá rozpouštědla.....	59
Tabulka 8 - Vasoaktivní látky.....	60
Tabulka 9 - Další chemikálie	60
Tabulka 10 - Připravené základní roztoky	61
Tabulka 11 - Krebsův roztok	62