

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra farmakologie a toxikologie



**Rigorózná práca**

**Štúdium mechanizmu vazorelaxačného účinku biochanínu A *ex vivo* na izolovanej aorte potkana**

Mechanism of the vasorelaxant effect of biochanin A studied *ex vivo* on isolated rat aorta

Hradec Králové, 2020

Diana Katiová

Prehlasujem, že táto rigorózna práca je mojim pôvodným autorským dielom. Literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pre spracovanie čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúri a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titula.

Diana Katiová

Na tomto mieste by som sa chcela poďakovať svojej vedúcej PharmDr. Jana Pourová, Ph.D. za odbornú pomoc a rady pri spracovaní rigoróznejšej práce a takisto za ochotu a trpezlivosť. Takisto by som sa chcela poďakovať Mgr. Thomas Migkos a PharmDr. Marie Vopršalová, CSc., ktorí sa podieľali na prevedení jej experimentálnej časti.

## Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Úvod.....  | 8  |
| 2     | Teoretická časť.....                                   | 9  |
| 2.1   | Kardiovaskulárny systém.....                           | 9  |
| 2.1.1 | Histológia ciev.....                                   | 9  |
|       | Artérie .....  | 12 |
| 2.1.2 | Vény .....   | 13 |
| 2.1.3 | Kapiláry.....  | 13 |
| 2.1.4 | Aorta.....   | 15 |
| 2.2   | Hladký sval.....                                       | 16 |
| 2.2.1 | Štruktúra hladkého svalu.....                          | 16 |
| 2.2.2 | Mechanizmus kontrakcie.....                            | 17 |
| 2.3   | Iónové kanály .....                                    | 18 |
| 2.3.1 | Napät'ovo riadené vápenaté kanály ( $BK_{Ca}$ ).....   | 18 |
| 2.3.2 | Napät'ovo riadené draslíkové kanály ( $K_v$ ).....     | 20 |
| 2.3.3 | Vápnikom aktivované draslíkové kanály (VGCC) .....     | 20 |
| 2.3.4 | Dovnútrausmerňujúce draslíkové kanály .....            | 21 |
| 2.3.5 | ATP-senzitívne draslíkové kanály .....                 | 22 |
| 2.3.6 | Ryanodinové receptory (RyRs).....                      | 22 |
| 2.3.7 | Inozitol-1,4,5-trifosfátové receptory ( $IP_3R$ )..... | 23 |
| 2.3.8 | TRP iónové kanály (Transient Receptor Potential).....  | 23 |
| 2.4   | Riadiace mechanizmy .....                              | 24 |
| 2.4.1 | Myogenná autoregulácia .....                           | 25 |
| 2.4.2 | Metabolická regulácia .....                            | 25 |
| 2.4.3 | Pomalé (dlhodobé) riadiace mechanizmy .....            | 26 |
| 2.4.4 | Nervové regulačné mechanizmy .....                     | 26 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.4.5 | Hormonálne regulačné mechanizmy .....   | 27 |
| 2.5   | Flavonoidy .....  | 28 |
| 2.5.1 | Biochanín A.....  | 30 |
| 3     | Cieľ práce.....   | 31 |
| 4     | Experimentálna časť .....   | 32 |
| 4.1   | Zvieratá a použitý materiál .....   | 32 |
| 4.1.1 | Pokusné zvieratá.....   | 32 |
| 4.1.3 | Použité chemikálie .....  | 33 |
| 4.1.4 | Anestézia .....   | 34 |
| 4.2   | Metodika .....  | 35 |
| 4.2.1 | Príprava Krebsovho roztoku.....   | 35 |
| 4.2.2 | Príprava testovanej látky .....   | 36 |
| 4.2.3 | Príprava experimentu .....  | 36 |
| 4.2.4 | Stabilizácia a záťaž.....   | 37 |
| 4.2.5 | Závislosť účinku biochanínu A na prítomnosti intaktného endotelu .....                                    | 38 |
| 4.2.6 | Ca <sup>2+</sup> -influx vs uvoľnenie zo sarkoplazmatického retikula.....                                 | 39 |
| 4.2.7 | Vtok Ca <sup>2+</sup> vs blokácia Ca <sup>2+</sup> kanálov L-typu .....                                   | 40 |
| 4.2.8 | Štatistická analýza .....   | 41 |
| 5     | Výsledky .....  | 42 |
| 6     | Diskusia.....   | 49 |
| 6.1   | Závislosť vazorelaxačného účinku biochanínu A na prítomnosti intaktného endotelu .....                    | 49 |
| 6.2   | Vplyv biochanínu A na Ca <sup>2+</sup> influx blokádou L-typu membránových Ca <sup>2+</sup> kanálov. .... | 54 |
| 6.3   | Účinok biochanínu A nezávislý na extracelulárnom Ca <sup>2+</sup> .....                                   | 57 |
| 8     | Zoznam skratiek.....  | 60 |
| 9     | Zoznam použitej literatúry .....  | 62 |

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Školiteľ: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Skoliteľ specialista: Mgr. Thomas Migkos

Poslucháč: Diana Katiová

Názov rigoróznej práce: Štúdium mechanizmu vazorelaxačného účinku biochanínu A *ex vivo*  
na izolovanej aorte potkana

Flavonoidy sú prírodné rastlinné sekundárne metabolity, ktoré sú známe širokým spektrom účinku. Mnohé z nich majú priaznivé účinky na ľudský organizmus. Majú protizápalové, antioxidačné účinky a okrem toho pozitívny vplyv na kardiovaskulárny systém.

Cieľom tejto práce bolo zistiť možné vazorelaxačné mechanizmy vybraného izoflavonoidu biochanínu A. Vazorelaxačný potenciál bol overený v *ex vivo* podmienkach na izolovaných aortálnych krúžkoch potkana Wistar. Získané výsledky potvrdili dávkovú závislú vazodilatáciu.

Chceli sme zistiť, či je jeho efekt závislý na prítomnosti intaktného endotelu a zistili sme, že jeho účinok je na prítomnosti endotelu nezávislý. Skúmali sme i vplyv biochanínu A na membránové  $\text{Ca}^{2+}$  kanály L-typu a či je jeho vazorelaxačný účinok závislý na extracelulárnom  $\text{Ca}^{2+}$ . Potvrdilo sa, že podobne ako nifedipín aj biochanín A blokuje kanály v plazmatickej membráne. Okrem toho bol tento flavonoid v prostredí bez  $\text{Ca}^{2+}$  v závislosti na dávke schopný vyvolať relaxáciu v prekontrahovaných kruhoch s fenylefrínom. Z toho vyplýva, že jeho vazodilatačný efekt je na influxe extracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$  nezávislý.

## **Abstract**

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxikology

Consultant: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Consultant specialist: Mgr. Thomas Migkos

Student: Diana Katiová

Title of Thesis: Mechanism of the vasorelaxant effect of biochanin A studied *ex vivo* on isolated rat aorta

Flavonoids are secondary plant metabolites which are known for their wide range of effects. Many of them have beneficial effects on the human organism. They have anti-inflammatory properties, antioxidant activity and positive effect on cardiovascular system.

The main aim of this thesis was to determine possible vasorelaxant mechanisms of action of selected isoflavonoid biochanin A. The vasorelaxation potential was verified in *ex vivo* conditions on isolated rat aortic rings. The results have confirmed dose-dependent induced vasodilatation.

Our experiments confirm that the vasodilatory effect of biochanin A is independent on the function of endothelium. Besides that the experimental part of this thesis is dealing with the effect of this substance on  $Ca^{2+}$  channels of L-type in the plasma membrane and whether vasorelaxant effect is dependent on extracellular  $Ca^{2+}$ . Our results confirm that similarly as nifedipine biochanin A blocks these channels as well. Moreover biochanin A in the medium without  $Ca^{2+}$  was able to induce relaxation with increasing dose in phenylephrine precontracted aortic rings. This shows that its effect is not dependent on the influx of extracellular  $Ca^{2+}$ .

## 1 Úvod

Kardiovaskulárny systém je sústava ľudského tela, ktorá zaisťuje transport látok, reguláciu a udržiavanie homeostázy. Kardiovaskulárne ochorenia postihujú čoraz väčšiu časť populácie v produktívnom veku v rozvinutých krajinách. Na etiopatogenéze sa podieľajú lokálne a systémové mechanizmy. Najdôležitejšiu úlohu z centrálnych mechanizmov má sympatický (hlavný neuromediátor noradrenalín) a parasympatický systém (mediátor acetylcholínu).

Endotelová vrstva ciev má z lokálnych mechanizmov veľký význam pri regulácii krvného tlaku a okrem toho produkuje látky podieľajúce sa na zrážaní krvi, rastových faktoroch pre delenie svalových buniek, „atď..“. Pre správnu funkciu musia byť v rovnováhe vazodilatačné, vazokonstrikčné, proagregačné a antiagregačné látky. Pri narušení vzniká endoteliálna dysfunkcia, ktorá môže prispieť k zvýšeniu kardiovaskulárnej mortality.

Hladká svalovina ciev má schopnosť zaistiť riadiace mechanizmy. Ovplyvnením týchto mechanizmov alebo len svalov sa dá regulovať krvný tlak. Látky, ktoré sú schopné ovplyvniť kontrakciu a relaxáciu hladkej svaloviny ciev delíme na vazokonstriktory a vazodilatátory.

V súčasnosti sa používa veľké množstvo liečiv s rôznymi mechanizmami účinku, napriek tomu sa neustále hľadajú nové štruktúry. Jednými z potencionálne prínosných látok sú prírodné flavonoidy, ktoré by mohli pomôcť pri liečbe vysokého krvného tlaku alebo aterosklerózy. Sú to polyfenolické zlúčeniny, ktoré sa bežne vyskytujú v ľudskej potrave. Existuje niekoľko skupín flavonoidov a ich účinok na organizmus sa môže líšiť. Priaznivé účinky polyfenolov boli najprv pridelené výhradne ich antioxidantným vlastnostiam kvôli fenolovým štruktúram. Flavonoidy majú významné ochranné účinky proti rôznym kardiovaskulárnym chorobám. Podľa ich molekulárnych štruktúr sa delia na: flavonoly, flavóny, flavanony, izoflavóny, antokyany a chalkóny. Táto práca sa bude zaoberať účinkami flavonoidov na kardiovaskulárny systém. Popísané budú možné mechanizmy vazodilatačného pôsobenia biochanínu A na preparátoch aorty potkana.



## **2 Teoretická časť**

### **2.1 Kardiovaskulárny systém**

Kardiovaskulárny systém distribuuje v organizme kyslík a výživné látky k tkanivám, splodiny k exkretčným orgánom a transportuje hormóny k cieľovým orgánom. Skladá sa z krvného a lymfatického vaskulárneho systému. Krvný vaskulárny systém sa skladá zo srdca a krvných ciev, ktoré sa delia na artérie, kapiláry a vény. Artérie tvoria rozvetvený systém a ich hlavnou funkciou je prinášať kyslík a nutričné látky k tkanivám. Kapiláry formujú prepojenú sieť v tkanivách a tu dochádza k výmene látok medzi krvou a tkanivom. Splyvaním kapilár vznikajú vény, ktoré distribujú krv s vysokým obsahom CO<sub>2</sub> (oxid uhličitý) a s metabolickými produktami k srdcu. Lymfatické cievy sa nachádzajú blízko ciev a ich funkciou je odvádzať prebytočnú tekutinu z medzibunkových priestorov.

Proces novotvorby ciev vplyvom endoteliálneho rastového faktoru je angiogenéza. Stena ciev je tvorená 3 vrstvami: tunica intima, tunica media a tunica adventitia. (Konrádová et al.2000)

#### **2.1.1 Histológia ciev**

##### **2.1.1.1 Tunica intima**

Tunica intima sa skladá z vrstvy endotelových buniek, ktoré tvoria longitudinálne usporiadané polygonálne ploché elementy.

Nie je to pravý epitel, lebo vzniká z mezenchýmu. Ploché jadro je uložené v centrálnej oblasti bunky a okolo jadra sa nachádza Golgiho komplex, mitochondriá, ribozómy a malé cisterny granulárneho endoplazmatického retikula. Vyskytujú sa tu i elementy cytoskeletu. Prítomnosť týchto mikrofilamentov súvisí pravdepodobne so schopnosťou týchto buniek kontrahovať. Tieto bunky patria medzi dlhožijúce elementy. Majú nízku mitotickú aktivitu. Okrem toho majú antitrombogénny účinok. Zabraňujú styk krvných doštičiek so subendotelovým tkanivom, ktoré je tvorené kolagenovým väzivom. Ten je miestom možného rozvoja aterosklerotických zmien. Proti aktivácii a agregácii krvných doštičiek pôsobí prostacyklín, trombomodulín, NO a tkaňový aktivátor plazminogén. Luminálna vrstva je potiahnutá vrstvou glykokalyxu, čo dáva endotelu nezmáčavosť, negatívny náboj a umožňuje väzbu rôznych molekúl. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Funkcia endotelu sa líši podľa úseku cievneho riečiska. Funguje ako semipermeabilná membrána. Zabezpečuje selektívny transport látok. Tieto látky môžu prechádzať paracelulárne alebo transcelulárne. Lipofilné látky, ako napríklad kyslík a CO<sub>2</sub> prechádzajú rýchlo cez vrstvu a hydrofilné látky cez póry. Vo vode rozpustné látky môžu okrem toho prechádzať aj transcytózou medzi bunkami. (Khaled et al. 2015)

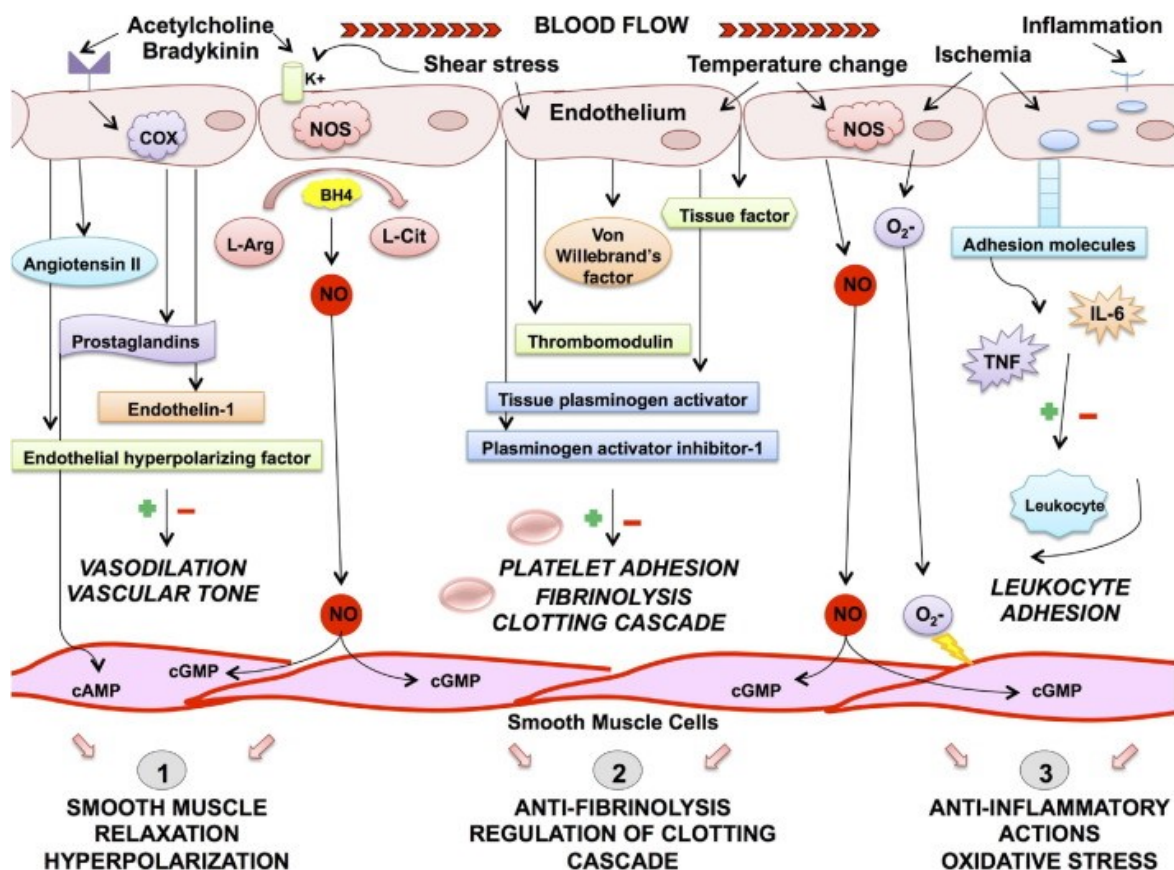
Endotel reguluje imunitné a zápalové reakcie tvorbou adhézných molekúl (E-selektíny, ICAM-1) a cytokínov. Metabolizuje rôzne hormony a modifikuje lipoproteíny. (Khaled et al. 2015)

Lokálne reguluje cievny tón, prietok krvi a krvný tlak. Endoteliálne bunky produkujú vazodilátory ako odpoveď na zmeny prietoku krvi. Tie bunky sú v kontakte s najvnútornejšou vrstvou hladkých svalových buniek a tvoria takzvaný myoendothelový kontakt. (Khaled et al. 2015)

Tromboxán A<sub>2</sub>, endotelíny sú látky pôsobiace vazokonstrikčne a prostacyklín s EDHF (hyperpolarizačným faktorom) vedie k relaxácii hladkého svalstva. Na povrchu endotelu je uložený enzým vyvolávajúci konstriktciu ACE (angiotenzín-konvertujúci enzým), ktorý aktivuje angiotenzín II a inaktivuje bradykinín a ovplyvní i syntézu ET-1 (endotelín-1). (Khaled et al. 2015)

Pri zvýšenej lineárnej rýchlosti toku krvi dôjde k uvoľneniu NO (oxidu dusnatý), ktorý spôsobuje vazodilatáciu. Je to ochranný mechanizmus, ktorý bráni v cievach vzniku vysokej lineárnej rýchlosti a tým turbulentnému prúdeniu. Ten totižto by mohol narušiť celistvosť endotelu a vytvoriť riziko vzniku trombu. NO je syntetizovaný premenou L-arginínu na L-citrulín čo je katalyzované NOS (NO-syntázou). Existujú 4 typy NOS: neuronálna, endoteliálna, mitochondriálna a indukovateľná v makrofágoch. (Khaled et al. 2015)

Okrem zmienovaných účinkov zohráva úlohu i pri proliferácii buniek. Rastové faktory ako sú EGF (endotelový rastový faktor), VEGF (vaskulárny endotelový rastový faktor), PDGF (dostičkový rastový faktor) a angiotenzín II podporujú rozmnožovanie buniek. Pomocou NO, PGI<sub>2</sub> (prostacyklín) a TGF- $\beta$  inhibujú proliferáciu. (Khaled et al. 2015)



Obrázok č. 1 Funkcia endotelu

Zdroj:

[https://www.google.cz/search?q=function+of+endothelium&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0a\\_hUKEwi4rpKO3rTjAhXfWxUIHTQKAZkQ\\_AUIECgB&biw=1366&bih=576#imgrc=QThIE5qpAjmQuM:](https://www.google.cz/search?q=function+of+endothelium&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0a_hUKEwi4rpKO3rTjAhXfWxUIHTQKAZkQ_AUIECgB&biw=1366&bih=576#imgrc=QThIE5qpAjmQuM:)

### 2.1.1.2 Tunica media

Hlavné elementy tejto vrstvy sú hladké svalové bunky, ktoré produkujú medzibunkovú hmotu a sú spojené pomocou gap junctions. Tunica media obsahuje glykosaminoglykány, chondroitín sulfát, proteoglykán a okrem nich sa vyskytujú rôzne elastické a retikulárne vlákna, ktoré dávajú elasticitu vrstve. Nervy sú vlákna autonómneho nervového systému. Vetvia sa vo vrstve, a tým inervujú hladkú svalovinu. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

### 2.1.1.3 Tunica adventitia

Hlavnou súčasťou tejto vrstvy je kolagénové väzivo.

Jednotlivé časti cievneho systému sa líšia v úprave jednotlivých vrstiev. V miestach s vyšším tlakom je tunica media silnejšia a bohatá na svalové bunky aj na elastické vlákna. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Výživa je zaisťovaná difúziou a imhibíciou výživných látok a kyslíka z krvi. Cievny s väčším priemerom ako 1mm majú vyvinutý systém vlastných ciev, tzv. vasa vasorum. Tie vznikajú ako vetvy artérií a vyživujú alebo sú zásobované susednými artériami. Častejšie sa vyskytujú v stenách žíl ako v artériách, kvôli nižšej koncentrácii kyslíka vo venóznej krvi. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Väčšina krvných ciev obsahujúce hladké svalové bunky má mohútne vyvinutú sieť nemyelinizovaných vazomotorických nervových vlákien. Hlavným neuromediátorom je epinefrín. Jeho uvoľnenie spôsobuje vazokonstrikciu. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

### Artérie

Sú takzvané rezistentné cievny regulujúce dodatočné napätie pri ejakcii krvi počas systoly. Podľa priemeru sa delia na arterioly a artérie. Tunica intima v endotelových bunkách arteriol obsahuje proteín potrebný pre koaguláciu krvi (Willebrandov faktor). Tunica media je zasa zložená z viacerých vrstiev hladkých svalových buniek. Endotelové bunky vysielajú malé výbežky, ktoré prichádzajú do styku s hladkými svalovými bunkami. Tie umožnia pôsobenie cirkulujúcich polypeptidov počas regulácie krvného tlaku. Interná elastická lamina zložená z elastínu sa nachádza v intime, ktorá obsahuje póry umožňujúce difúziu látok z krvi. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Artérie je možné rozdeliť na artérie svalového a elastického typu.

Do prvej skupiny patria artérie malého a stredného kalibru, ktoré majú silnú stenu. Tunica media týchto artérií je tvorená až zo 40 vrstiev hladkých svalových buniek. Tieto bunky sú usporiadané do sväzkov tvoriacich špirálu v nízkom závite. Medzi nimi sa nachádzajú elastické vlákna. V stenách vrstvy tunica adventitia sú umiestnené nervové vlákna, lymfatické kapiláry a vasa vasorum. Vlastnia regulačný aparát, ktorý je v stene. Tepny v blízkosti srdca

plnia funkciu pružníku. Transformujú pulzáciu krvi na kontinuálne prúdenie. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Artérie veľkého kalibru sú elastického typu. Do tejto skupiny patrí aorta a truncus pulmonalis. Medzi endotelovými bunkami sú vytvorené zonula adhaerentes, tight junctions a gap junctions. Tie oddeľujú priestor od hlbších vrstiev, riadia prienik plazmy a bránia kontaktu krvných elementov s medzibunkovou hmotou. Tunica intima týchto artérii je hrubšia ako u artérii svalového typu. Membrana fenestrata sa nachádza vo vrstve tunica media koncentricky usporiadane. Zaisťuje kontinuálny tok krvi v priebehu srdcovej diastoly. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

### **2.1.2 Vény**

Žily, kapacitné cievy, majú vplyv na srdcové predpätie, a preto aj na veľkosť komory počas diastoly.

Delíme ich na venuly a vény, podobne ako artérie. Tunica adventitia je u žíl všeobecne silnejšia voči artériam, ktoré majú hrubšiu tunicu mediu. Tunica adventitia sa skladá z kolagénového väziva tvoreného z kolagénových vlákien. V tejto vrstve sa vyskytujú aj hladké svalové bunky. Štruktúra veľkých vén sa mení v závislosti na lokalizácii. Veľké tepny ležiace pod úrovňou srdca obsahujú zväzky longitudinálne usporiadaných hladkých svalových buniek, ktoré spevňujú stenu vény a zabraňujú jej distenzii. V malých a stredne veľkých vénach sa nachádzajú chlopne, ktoré sú typické hlavne pre dolné končatiny. Sú to kapsovitité výchličky vrstvy tunica intima tvorené elastickým väzivovým tkanivom ležiacim proti sebe. Ich hlavnou funkciou je usmerňovanie toku krvi smerom k srdcu. Ich uzavretie bráni spätnému toku krvi. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

### **2.1.3 Kapiláry**

Typické kapiláry sú široké, aby prechodne deformované erytrocyty boli schopné prechodu. Stena je tvorená jednou vrstvou endotelových buniek, ktoré sa točia a vytvria tak cylindrický priestor. Tieto bunky sú ploché a pinocytické vezikuly zaisťujú transcelulárny transport rôznych látok. Veľký počet týchto vezikúl sa vyskytuje aj vo svalovom tkanive. V kapilárach nervového systému je ich zase málo. Rozdiel v permeabilite ovplyvní aj počet a charakter zonulae occludentes. Pericyty obklopujú endotelové bunky, ktoré vytvoria bazálnu laminu a obsahujú proteíny (aktín, myozín, tropomyozín) umožňujúce kontrakciu buniek. Okrem toho prispievajú k diferenciacii endotelu a zabraňujú nadbytočnú novotvorbu kapilár. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Podľa štruktúry endotelových buniek je možné kapiláry rozdeliť na 4 skupiny. Kapiláry so súvislou výstelkou neobsahujú žiadne póry ani fenestrácie. Sú to somatického typu. Ďalšiu skupinu tvoria kapiláry fenestrované, viscerálne, ktoré obsahujú otvory prepažené diafragmou. Diafragma je tenšia ako biologická membrána a niekedy hrubšia v centrálnej oblasti. Typická je pre orgány, kde dochádza k rýchlej výmene látok. Kapiláry s pórami sú typické pre glomeruly obličiek. Poslednú skupinu tvoria sinusoidné kapiláry. V okolí kapilár sa vyskytujú makrofágy, napr. v pečeni alebo v kostnej dreni. Výmena látok medzi krvou a tkanivom je jednoduchá, ale tok krvi je výrazne spomalený. Plyny a látky s hydrofóbnymi vlastnosťami môžu voľne prestupovať po koncentračnom spádu. Hydrofilné látky a voda, ktoré neprechádzajú pasívnym transportom, môžu prestupovať transcelulárnou alebo paracelulárnou cestou. Transcelulárna cesta je umožnená špeciálnymi prechodmi alebo transportnými mechanizmami. U paracelulárnej cesty záleží prestup na prítomnosti tight junctions. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Pred systémom vlások sa nachádzajú prekapiláry. Prekapilárny sfinkter je prstenec tvorený hladkými svalovými bunkami, ktorý reguluje prietok krvi kapilárami. Na konci kapilárneho systému sú postkapiláry. Tie umožnia prienik tekutín a krvných elementov do tkaniva a sú citlivé na vazoaktívne látky (histamín, serotonín). (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

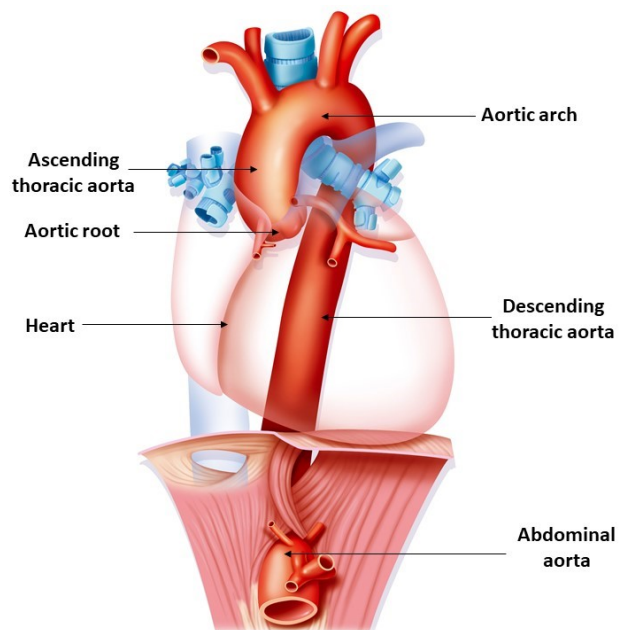
Arteriovenózne anastomózy a glomy tvoria sieť medzi artériami a vénami. Väčšinou sú tieto spojenia na úrovni veľmi malých tepien. Sú bohato zásobené vegetatívnymi nervovými vláknami a hrajú dôležitú úlohu pri termoregulácii, regulácii krvného tlaku, menštruácii a erekcii. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Orgány s vysokou metabolickou aktivitou majú bohatú kapilárnu sieť. Portálne systémy sa delia na arteriálne a venózne. Prvá skupina sa nachádza v obličkách. Vas efferens sa rozvetví a tvorí glomerulus. Z neho vystupuje vas efferens, ktorá tvorí kapilárnu sieť okolo tubulov obličky. Venózne portálne systémy sa nachádzajú v pečeni. Venae portae sa v lalôčkách rozpadá na sieť krvných sinusoidov, ktoré ústia do vena centralis a do vena hepatica. To umožní hormónom a výživným látkam prestup pred tým, ako sa krv vráti do srdca. (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

Cievy sú obklopené väzivom, do ktorého priamo prechádza tunica extra. Tým vytvorí mriežkovitú štruktúru, čo im zabezpečí pružnosť. Na končatinách je často tepna a jej súbežné žily uzavrená v spoločnom väzivovom obale (vagina vasorum). (Konrádová et al. 2000, Lüllman et al. 2012)

#### 2.1.4 Aorta

Aorta, srdcovnica, je najväčšia diametrálna artéria v tele, ktorá vystupuje z ľavej srdcovej komory a zostupuje vedľa chrbtice. Vzostupná časť aorty (Aorta ascendens) je oddelená od ľavej srdcovej komory aortálnou chlopňou. Začiatok má vlastnú vasa vasorum, ktorá pochádza z koronárnych tepien. Oblúk aorty sa vetví na tri hlavné vetvy (Truncus brachiocephalicus, Aorta carotis communis a Aorta subclavia sinistra), ktorých hlavnou funkciou je zásobovanie hornej časti tela a hlavy. Konečná zostupná časť aorty (Aorta descendens) sa vetví na hrudnú a brušnú časť. (Čihák 2002)



Obrázok č. 2 Aorta (Čihák 2002)

## 2.2 Hladký sval

### 2.2.1 Štruktúra hladkého svalu

Hladké svalstvo sa vyznačuje rozťažnosťou a plasticnosťou. Okrem toho je schopné i mitózy. Povrchová membrána hladkej svaloviny obsahuje veľké množstvo receptorov a v ich blízkosti sa nachádza SR (sarkoplazmatické retikulum). V priečne pruhovanom svale je hladké ER (endoplazmatické retikulum) vysoko diferenciované. Má špeciálne označenie, sarkoplazmatické retikulum, ktoré sa zúčastní na kontrakcii myofibríl. (Lüllman et al. 2012, Trojan et al. 2003)

Vonkajší obal je tenká vrstva polysacharidov s kolagénovými vláknami. Cytoplazma s organelami sa nazýva sarkoplazma. Myofibrily sú takzvané cylindrické organely z kontraktálnych elementov (aktín, myozín) organizované do sarkomér. Tvoria fibrilárny proteínový komplex, ktorý je funkčnou časťou svalového vlákna. SR s T-tubulárnym systémom tvorí vnútorný vodiaci systém. AP (akčný potenciál) sa šíri pozdĺž sarkolemy cez T-tubulárny systém a depolarizuje cisterny a SR. Reguláciou koncentrácie  $Ca^{2+}$  v sarkoplazme hrá SR dôležitú úlohu pri určovaní kontrakcii. (Lüllman et al. 2012)

V bunkách sa oddelia vápenaté ióny a zabezpečí sa nízka koncentrácia v sarkoplazme. Počas excitácie a depolarizácie dochádza k otvoreniu iónových kanálikov a malé množstvo  $Ca^{2+}$  vstúpi cez plazmatickú membránu. To stimuluje ďalšie uvoľnenie zo SR. Pri repolarizácii sú reabsorbované, čo je dôležitý brániaci mechanizmus vzniku ďalšieho svalového napätia. (Toyoshima et al. 2000)

V jednotkovom hladkom svale gap junctions umožnia elektrickú väzbu membrán a šírenie depolarizácie. V hladkej svalovine sa nachádzajú špeciálne pacemakerové bunky. Rytmicky tvoria AP, čím udržiavajú svalový tonus hladkého svalstva. Druhý typ predstavuje viacjednotkový hladký sval, ale jeho bunky v provnaní s predošlými, nie sú spojené. To znamená, že kontrakcia sa v ňom nešíri, ale je citlivý na niektoré mediátory a hormóny. (Trojan et al. 2003)

V miestach s veľkým množstvom svalových buniek ležia bunky tesne vedľa seba a tvoria vrstvy, pruhy alebo protibežné systémy. Sú pokryté bazálnou membránou a upevnené pomocou elastických a kolagénových vlákien, čo umožňuje prenos ťahových síl. Svalové bunky obsahujú dva systémy prepojených filamentov: cytoskelet a sieť aktínových a myozínových filamentov. Cytoskelet je zložený z intermediálnych filamentov



(desmín, vimentín) a nesvalového aktínu. Je upevnený v zónach zahustenia v cytoplazme a zabezpečí upevnenie kontraktilného aparátu. Myofilamenty sú usporiadané šikmo. (Lüllman et al. 2012)

Mechanické spoje medzi týmito bunkami zaisťuje ECM (extracelulárny matrix). Aktínové filamenty sú v pripojovacích miestach napojené na integríny, ktoré sa viažu na rôzne zložky ECM. Pomocou tohto reťazca je napätie prenesené cez sarkolemu a ECM na susedné bunky. (Lüllman et al. 2012)

### **2.2.2 Mechanizmus kontrakcie**

Nervové vlákna tvoria varikozity vyplnené vezikulami, ktoré exocytózou uvoľnia rôzne mediátory. V blízkosti týchto varikozít sa nachádzajú krvné cievy ležiace blízko svalových membrán, kde priamo riadia motoriku. Šírenie je zaistené spojením membrán elektricky a postupným šírením vlny zvýšenej koncentrácie mediátora v medzibunkovom priestore. Na vznik akčného potenciálu má vplyv prúd sodíkových a vápenatých iónov. V bunkách sa nachádzajú kontraktilné vlákna, aktín a myozín, ktoré sú v denzných telieskach a páskach z aktínu. Množstvo aktínu je vyššie ako v kostrovej svalovine, a to kvôli vyššiemu obsahu tropomyozínu. Myozínové a aktínové filamenty netvoria vysoko usporiadanú štruktúru sarkomer, tým pádom je rozpätie dielky hladkého svalu aktívnej tenzie vysoké. Interakcia myozínu a aktínu je riadená komplexom kalmodulín- $\text{Ca}^{2+}$ , ktorý katalyzuje fosforyláciu hlavy myozínu pomocou cAMP (cyklický adenosínmonofosfát). Aktivovaný myozín interaguje s aktínom, a tým dôjde ku kontrakcii. Relaxácia je naopak spojená s defosforyláciou myozínu myozínfosfatázou.

V pokojovej fáze sa 2 proteíny, troponín a tropomyozín, viažu na aktín a inhibujú interakciu medzi aktínom a myozínom. Zmena koncentrácie iónov počas depolarizácie zmení konformáciu proteínov a aktín s myozínom interaguje. (Trojan et al. 2003)

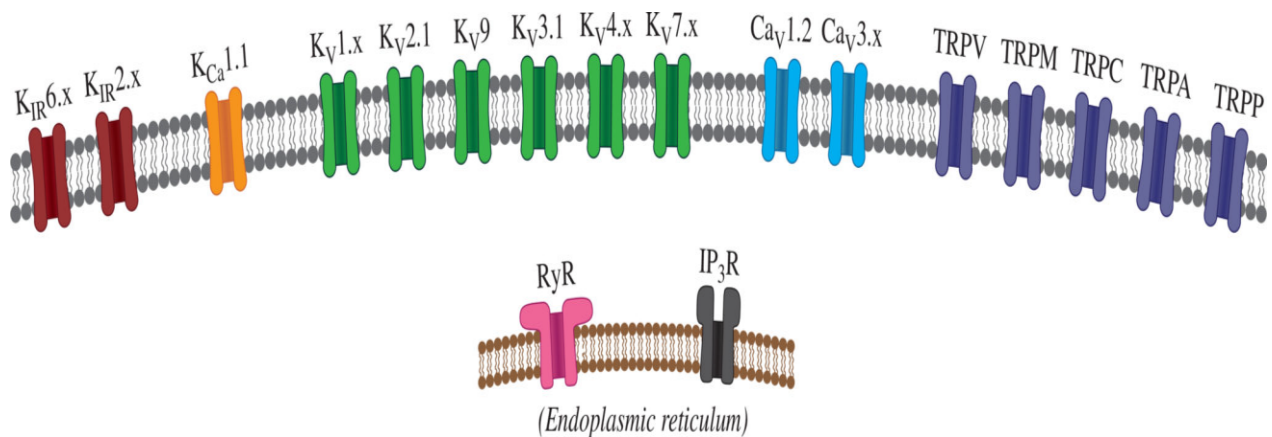
Vlastný proces je regulovaný intracelulárnou hladinou  $\text{Ca}^{2+}$ . Koncentrácia tohto iónu môže byť zvýšená vstupom extracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$  a uvoľnením z intracelulárnych zásob umiestnených v SR. Pri regulácii a ukončení sťahu majú význam aj iné organely, ktoré vycytávajú  $\text{Ca}^{2+}$  ako napr. mitochondrie. Depolarizácia membrány vyvolá zvýšenú difúziu  $\text{Ca}^{2+}$  do bunky cez kanály a uvoľnenie zo SR, a to buď priamym pôsobením elektrického poľa, alebo zvýšenou hladinou v cytoplazme. (Trojan et al. 2003)

## 2.3 Iónové kanály

Iónové kanály v plazmatickej membráne a v ER hladkej svaloviny v ciev majú dôležitú úlohu v regulácii koncentracii  $\text{Ca}^{2+}$ . Intracelulárny  $\text{Ca}^{2+}$  v hladkej svalovine je hlavným determinantom vaskulárneho tónu a kontroluje aktivitu MLCK (kináza ľahkého reťazca myozínu) a ich fosforyláciu.

Iónové kanály ovplyvnia membránový potenciál, čo má vplyv nie len na influx  $\text{Ca}^{2+}$  cez napäťovo riadené kanály, ale i na elektrochemický gradient iónov. Sú ovplynené vazokonstriktormi a vazodilatátormi.

V plazmatickej membráne hladkej svalovine sa vyskytujú nasledujúce iónové kanály: napäťovo riadené draslíkové kanály, vápnikom aktivované draslíkové kanály, napäťovo riadené vápenaté kanály a TRP kanály. Membrána ER obsahuje ryanodínové receptory a inozitol-1,4,5-trifosfátové receptory. (Tykocki et al. 2018)



Obrázok č. 3 Iónové kanály v plazmatickej membráne a v endoplazmatickom retikule  
(Tykocki et al. 2018)

### 2.3.1 Napäťovo riadené vápenaté kanály (BK<sub>Ca</sub>)

Hlavným podnetom otvorenia tých kanálov je depolarizácia membrány kvôli vtoku  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Cl}^-$  iónov alebo blokácia draslíkových kanálov. Negatívny náboj na vnútornej strane membrány udržuje tie kanály uzatvorené. Keď začne na intracelulárnej strane bunkovej membrány náboj klesať, dochádza ku konformačnej zmene kanálového proteínu a kanály sa otvoria. (Veizerová et al. 2007)

LVA (low voltage activated) je nízkoerahový kanál, ktorý je aktivovaný aj inaktivovaný malou depolarizáciou. Je zastúpený vo veľkom množstve buniek ako napr. neuróny, hladký sval, sinoatriálny uzol, a je spájaný s pacemakerovou aktivitou. HVA (high voltage activated) sú vysokoprahové kanály aktivované veľkou zmenou membránového potenciálu a otvárajú sa na dlhú dobu. Sú zastúpené v kardiovaskulárnom systéme, endokrinných bunkách a v neurónoch. Alfa subjednotka je funkčná časť kanálu a beta subjednotka má modulačnú úlohu. (Veizerová et al. 2007)

BK<sub>Ca</sub> kanály sa nachádzajú v rôznych bunkách a sú zapojené do regulácie dôležitých fyziologických procesov: uvoľnenie neurotransmiterov, kontrakciu hladkej svaloviny. (Brenner et al. 2000; Herrera et al. 2000, Raffaelli et al. 2004) Napríklad v endotelových bunkách ovplyvnia hyperpolarizáciu, vazodilatáciu a zlepšia endoteliálnu dysfunkciu. Ovplyvnia aj vazodilatáciu koronárnych artérií. Mediátor, hyperpolarizačný faktor, aktivuje tie kanály a látky spôsobujúce vazokonstrikciu inhibujú tie kanály. (Vetri et al. 2014)

Látky vyvolávajúce vazokonstrikciu ako napríklad norepinefrín, endotelín, angiotenzín II, serotonin pôsobia cez G<sub>q</sub>PCR (receptor spojený s G<sub>q</sub>-proteínom). Sú spojené s fosfolipázou a vytvoria DAG (diacylglycerol), ktorý v prítomnosti Ca<sup>2+</sup> iónov aktivujú PKC (proteínkináza C). Ten fosforyluje vápenaté kanály a zvýši pravdepodobnosť otvárania tých kanálov. G<sub>q</sub>PCR aktivácia môže stimulovať PIP<sub>3</sub>K (fosfatidylinozitol 3-kináza) a ten má vplyv na PKC, ktorý aktivuje SRC a zároveň vápenaté kanály. PIP<sub>3</sub>K bez zapojenia PKC a SRC je tiež schopný aktivácie. Integríny sú tiež schopné spustenia SRC signálnej dráhy. (Tykocki et al. 2018)

Agonisti G<sub>s</sub>PCR (receptor spojený s G<sub>s</sub>-proteínom) ako napríklad adenosín, prostacyklín, isoproterenol, aktivujú AC, ktorý vyvolajú zvýšenú tvorbu cAMP a ten aktivuje PKA (proteínkináza A). Fosforylácia PKA zvýši aktivitu Ca<sup>2+</sup>. (Tykocki et al. 2018)

Membránová hyperpolarizácia vyvolaná otváraním draslíkových kanálov a blokáciou vstupu Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a Cl<sup>-</sup> iónov deaktivuje tie kanály. Okrem toho vysoká hladina cAMP a NO deaktivuje tiež. Dihydropyridinové deriváty (nifedipín, nimodipín), fenyalkylamín (verapamil) a benzotiazepín (diltiazem) sú selektívne blokátory napäťovo riadených kanálov. (Tykocki et al. 2018)

Draslíkové kanály majú hlavnú úlohu v regulácii membránového potenciálu buniek ciev, ktorý má priamy vplyv na tónus. Funkčný draslíkový kanál obsahuje štyri alfa podjednotky a tie tvoria cestu pre prechod iónov. Beta podjednotky modulujú ich vlastnosti a zvyšujú diverzitu kanálov. (Cox 2005)

Aktivitu a vlastnosti týchto kanálov ovplyvňuje fosforylácia. Vazokonstriktory sa viažu hlavne na G proteíny, ktoré aktivujú špecifické fosfolipázy. Tie tvoria druhých poslov DAG a IP<sub>3</sub> (inozitol-1,4,5- trifosfát) a spolu s vápenatými iónmi aktivujú proteínkinázu C. (Standen et al., 1998). Vazodilatátory aktivujú adenylátcyklázu alebo guanylátcyklázu. Tie enzýmy zvyšujú cAMP a cGMP (cyklický guanozínmonofosfát) a aktivujú proteínkinázu A, ktoré fosforylujú tie kanály. (Tykocki et al. 2018)

### **2.3.2 Napät'ovo riadené draslíkové kanály (K<sub>v</sub>)**

Sú aktivované membránovou depolarizáciou a negatívne regulujú membránový potenciál spolu s BK<sub>Ca</sub> kanálmi. (Jackson 2005) Ich aktivita udržuje pokojový membránový potenciál.

Agonisti pôsobiace cez G<sub>s</sub>PCR stimulujú tvorbu cAMP a aktiváciu PKA, ktorý fosforyluje kanáliky. Medzi ďalšie kinázy ovplyvňujúce K<sub>v</sub> patria Rho-kináza, Ca/kalmodulin-dependentná kináza II a kaseín kináza. Vazodilatátory ako NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>S môžu aktivovať tie kanáliky takisto. Látky vyvolajúce vazokonstrikciu pôsobia cez receptory spojené s G<sub>q</sub> inhibujú ich činnosť rôznymi mechanizmami: aktivácia fosfolipázy, SRC, Rho-kinázy a zvýšenie intracelulárnej hladiny Ca<sup>2+</sup>. (Tykocki et al. 2018)

Vazokonstriktory depolarizujú membránový potenciál a aktivujú vtok Ca<sup>2+</sup> iónov do bunky. (Mulvany et al., 1982). Zvýšená hladina toho iónu vyvolá vazokonstrikciu a inhibuje tie kanály. Inhibícia sa ukončí, len ak sa aktivujú BK<sub>Ca</sub> kanály a vykompenzujú ten pokles. (Cox et al., 2006)

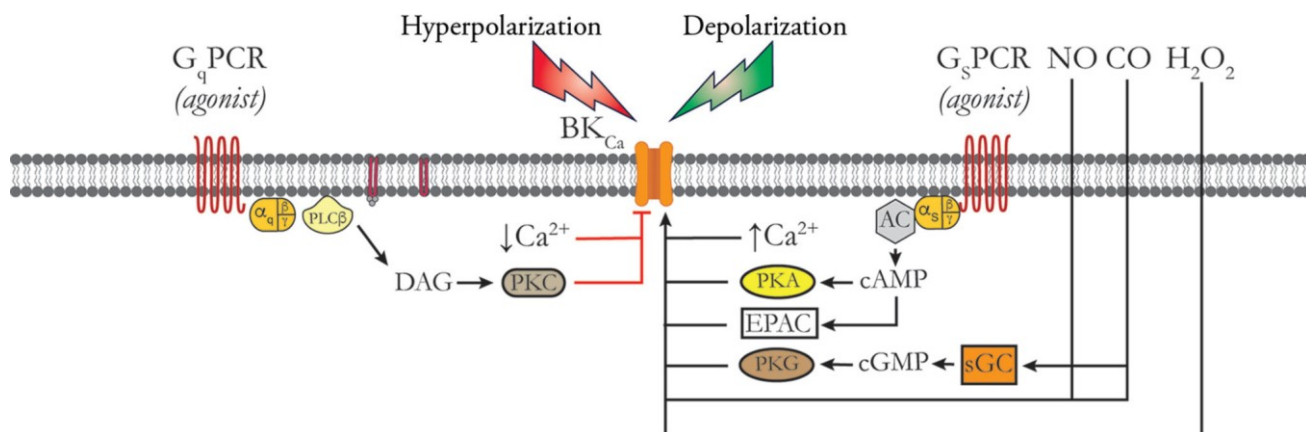
### **2.3.3 Vápnikom aktivované draslíkové kanály (VGCC)**

Vápnikom aktivované K<sup>+</sup> kanály hladkého svalu ciev sú vysoko vodivostné kanály. Patria do rodiny napät'ovo-ovládaných. Sú aktivované membránovou depolarizáciou a aj nárastom tých iónov. Vzhľadom na malú vzdialenosť od sarkoplazmatického retikula môžu byť vystavené vysokým koncentráciám Ca<sup>2+</sup>. Existujú v signálnych komplexoch s napät'ovo ovládanými Ca<sup>2+</sup> kanálmi, proteínkinázami a ďalšími signálnymi molekulami. (Perez et al., 1999). (Keef et al., 2001). Prietok Ca<sup>2+</sup> aktivuje tie kanály, nepriamo hyperpolarizuje membránu a podporuje uzatvorenie VGCC. (Tykocki et al. 2018)

Membránová depolarizácia kanálov môže byť vyvolaná buď vstupom iónov  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  cez iónové kanály alebo blokádou vstupu  $\text{K}^+$ . Ďalšia možnosť stimulácie je zvýšenie subsarkolemálnej hladiny  $\text{Ca}^{2+}$ . (Tykocki et al. 2018)

Vazodilatátory pôsobiace cez  $\text{G}_s\text{PCR}$  podporujú tvorbu cAMP, ktorý aktivuje PKA a tým kanály. Tieto látky môžu okremtoho aktivovať kanály aj výmenou EPACs. NO a CO sú látky, ktoré pôsobia cez tvorbu cGMP, ale môžu aj priamo aktivovať spolu s  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Tykocki et al. 2018)

Vazokontrikciu spôsobujúce látky, ktoré sú spojené s  $\text{G}_q\text{PCR}$  receptormi a pôsobia cez tvorbu DAG, majú inhibičný efekt na tie kanály. Takisto ako hyperpolarizácia spôsobená otváraním draslíkových kanálov alebo blokádou vstupu iónov a pokles hladiny sunarkolemálneho vápniku. (Tykocki et al. 2018)



Obrázok č. 4 Aktivácia a inaktivácia vápnikom aktivovaných draslíkových kanálov (Tykocki et al. 2018)

### 2.3.4 Dovnútrausmerňujúce draslíkové kanály

Ovplyvňujú pokojový potenciál hlavne v malých artériách. Ďalej tvoria metabolický senzor pre zvýšenú koncentráciu draslíka v extracelulárnom prostredí a môžu byť zodpovedné za vazodilatáciu a zvýšenie krvného prietoku počas neuronálnej aktivity CNS alebo počas cvičenia. (Haddy et al., 2005).

Hyperpolarizácia a blokácia iónových kanálov pre ióny  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  aktivujú draslíkové kanály toho typu. Okrem toho zvýšená extracelulárna koncentrácia draslíku patrí tiež medzi hlavné podnety. (Tykocki et al. 2018)

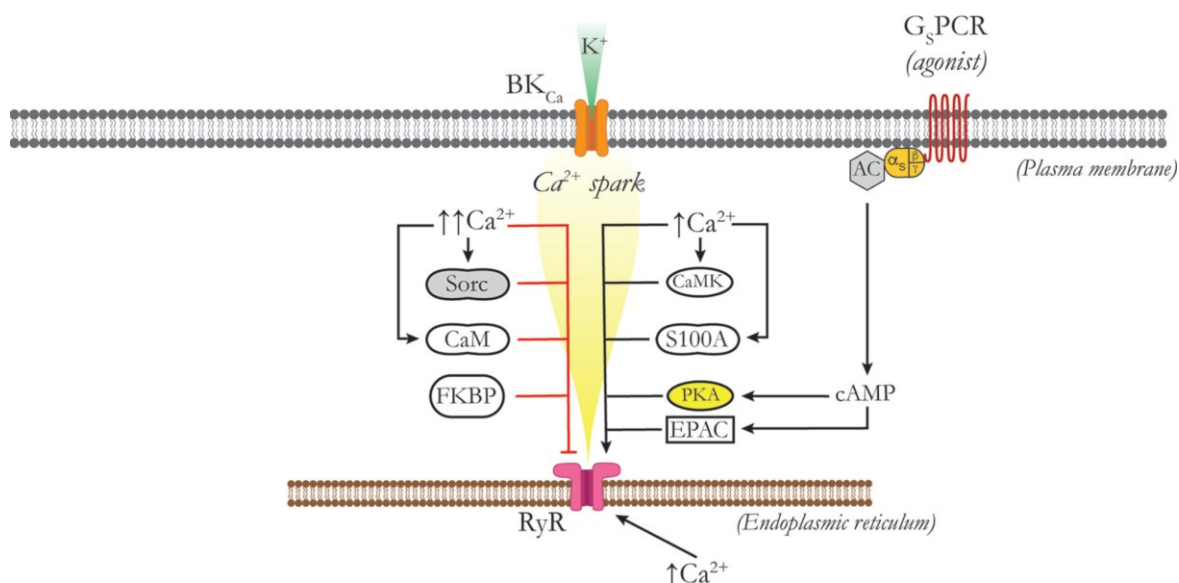
Vazodilatátory pôsobiace cez  $G_s$ PCR ich aktivujú a NO pôsobiaci cez produkciu cGMP takisto. Vazokonstriktory, ktoré aktivujú produkciu DAG, majú na tie kanály inhibičný vplyv. Membránova depolarizácia vyvolaná blokáciou draslíkových kanálov a otváraním kanálov pre  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Cl^-$  ióny blokujú aktivitu tých kanálov. (Tykocki et al. 2018)

### **2.3.5 ATP-senzitívne draslíkové kanály**

Tvorí prepojenie medzi metabolizmom a membránovým potenciálom. Ako pre ostatné draslíkové kanály aj pre tie kanály je rozhodujúca fosforylácia. Sú aktivované poklesom hladiny intracelulárneho ATP (adenozíntrifosfát). Taktiež ich pozitívne stimulujú vazodilatátory pôsobiace cez  $G_s$ PCR, NO a  $H_2S$ . Látky vyvolávajúce konstrikciu a zvýšená koncentrácia ATP má na nich opačný efekt. Okrem toho zvýšenie hladiny intracelulárneho  $Ca^{2+}$  aktivuje kalcineurín, a ten inaktivuje ATP-senzitívne kanály takisto. (Tykocki et al. 2018)

### **2.3.6 Ryanodinové receptory (RyRs)**

Sú to iónové kanály, ktoré sa nachádzajú na SR blízko plazmatickej membrány a uvoľňujú  $Ca^{2+}$  zo zásob. Hlavnými podnetmi aktivácie je mierne zvýšenie hladiny cytoplazmatického  $Ca^{2+}$  alebo zníženie koncentrácie týchto iónov. Stimulácia RyR je ovplyvnená pomocou cytozolického  $Ca^{2+}$ , a to aktiváciou kanálov priamo tým iónom cez kalcium/kalmodulín-dependentnú proteínkinázu. Aktivované môžu byť fosforyláciou alebo interakciou  $Ca^{2+}$  s  $Ca^{2+}$  viažúcou bielkovinou S100, ktorá kompetuje s kalmodulínom o väzebné miesto. Vazodilatátory spôsobujúce zvýšenú produkciu cAMP fosforylujú RyR a zvýšia časté opakované uvoľnenie  $Ca^{2+}$  z ER. cAMP môže aktivovať tieto receptory aj cez EPAC. RyR-dependentné uvoľnenie  $Ca^{2+}$  indukuje hyperpolarizáciu a vazodilatáciu cez  $BK_{Ca}$  kanály. Vysoká hladina intracelulárneho  $Ca^{2+}$  má inhibičný vplyv na RyR aktivitu, a to pomocou bielkoviny viažúcej  $Ca^{2+}$  sorcín alebo kalmodulín. Aktivita môže byť znížená i interakciou FK-506 viažúcej k proteínu 12 a 12A FKBP. (Tykocki et al. 2018)



Obrázok č. 5 Ryanodinové receptory v endoplazmatickom retikule

(Tykocki et al. 2018)

### 2.3.7 Inozitol-1,4,5-trifosfátové receptory (IP<sub>3</sub>R)

Sú intracelulárne Ca<sup>2+</sup> kanály na povrchu sarkoplazmatického retikula. Hlavnými aktivátormi tohto receptora sú zvýšenie IP<sub>3</sub> a mierne zvýšenie cytoplazmatického Ca<sup>2+</sup>. Aktivácia pomocou Ca<sup>2+</sup> je regulovaná priamym efektom Ca<sup>2+</sup> na kanály alebo pomocou Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin-dependentnej kinázy. Vazokonstriktory pôsobiace cez G<sub>q</sub>PCR zvýšia produkciu IP<sub>3</sub> a stimulujú uvoľnenie vápenatých iónov cez IP<sub>3</sub>R. Aktivované IP<sub>3</sub>R priamo ovplyvnia BK<sub>Ca</sub> a TRPC<sub>3</sub> kanály v plazmatickej membráne. Zvýšená hladina Ca<sup>2+</sup> inhibuje aktivitu kanálov a NO fosforylácia IRAG tiež inhibuje IP<sub>3</sub>R aktivitu. Vazodilatátory, ktoré pôsobia cez G<sub>s</sub>PCR a stimulujú tvorbu cAMP majú tiež inhibičný efekt na tie receptory. (Tykocki et al. 2018)

### 2.3.8 TRP iónové kanály (Transient Receptor Potential)

TRP kanály sa charakteristicky vyskytujú v senzorických neurónoch, ale sú exprimované aj v ostatných tkanivách a orgánoch (pankreas, enterochromafinné bunky, keratinocyty, močový mechúr, pľúca). Delia sa do 6 podrodín: TRPC (kanonické), TRPM (melastatinové), TRPV (vaniloidné), TRPA (ankyrinové), TRPP (polycystinové) a TRPML (mukolipinové). Pri rôznych fyziologických funkciách majú TRP kanály nezastupiteľnú úlohu. Ovplyvnia detekciu teploty, bolestivých podnetov, určenie citlivosti neurónov na cudzorodé látky

(štiplavé složky potravín, rastlinné dráždivé deriváty). (Jordt et al., 2004, Pedersen et al., 2005)

Zvýšený intravaskulárny tlak aktivuje  $G_q$ PCR a to je spojené so zvýšenou formuláciou DAG a IP3. DAG stimuluje TRPC<sub>6</sub> kanály, cez ktoré vstúpi  $Ca^{2+}$ , a IP3 uvoľní  $Ca^{2+}$  z ER.

Miestne zvýšenie cytozolovej koncentrácie  $Ca^{2+}$  aktivuje TRPM<sub>4</sub>-depentný  $Na^+$  influx, membránovú depolarizáciu a otváranie Ca kanálov. To má za následok kontrakciu hladkej svaloviny. Podobný mechanizmus je aktivovaný v reakcii na  $G_q$ PCR agonistov cez PLC $\beta$  a TRPC<sub>3</sub> kanály. (Tykocki et al. 2018)

## 2.4 Riadiace mechanizmy

Regulačné mechanizmy musia zaistiť celkovú funkciu obehového systému a rozdielne potreby jednotlivých tkanív a orgánov. Podľa oblasti pôsobenia sa delia na miestne a celkové. Miestna regulácia je reakcia hladkej svaloviny arterioly na lokálne podmienky a podnety. Autoregulácia udržiava prietok krvi tkanivom konštantne pri zmenách a prispôbuje metabolickú aktivitu.

Na pokyny z mozgového kmeňa, kde sa nachádza centrum regulačných mechanizmov, reaguje centrálna regulácia.

Centrá:

Vazomotorické centrá sa nachádzajú v predĺženej mieche ako súčasť retikulárnych formácií. Regulujú pokojovú aktivitu sympatických vazokonstrikčných vlákien, a tým spôsobom udržiava kľudový tonus. Tieto centrá sú ovplyvnené hypotalamom, ktorý vyvolá selektívnu vazokonstrikciu v určitých orgánoch a zúčastňuje sa pri poplachových reakciách. Organizmus sa aktiváciou sympatiku pripravuje na energetický náročný výkon. Všetky centrá sú pod kontrolou mozgového kmeňa.

Oba riadiace mechanizmy existujú vo všetkých tkanivách, ale ich význam sa líši. (Trojan 2003)



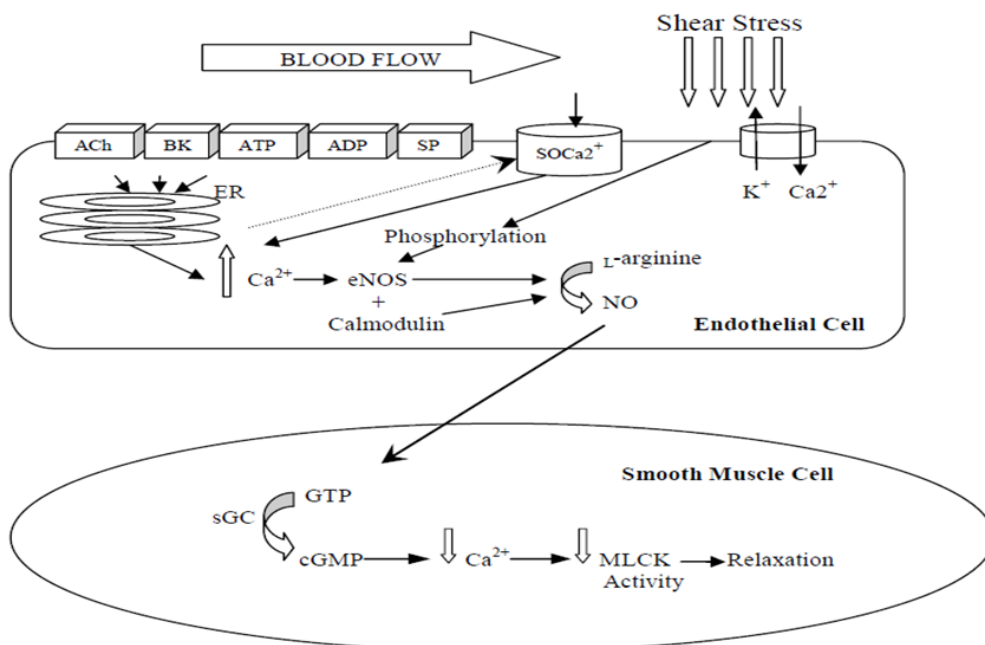
### 2.4.1 Myogenná autoregulácia

Ten riadiaci mechanizmus udržuje stály prietok i pri zmene tlaku. Zvýšený tlak spôsobí rozťaženie cievnej steny, čo vyvolá kontrakciu hladkej svaloviny a zmenši priesvit cievy. Odpor krvi sa zvyšuje, ale prietok krvi zostane nezmenený. Tá myogenná autoregulácia sa výrazne uplatňuje v obličkách. Umožňuje prietok krvi glomerulárnymi kapilármi nezávisle na zmenách tlaku, čiže funkcia sa nemení pri výkyvoch arteriálneho tlaku. Ďalším orgánom, kde sa uplatňuje myogenná autoregulácia je mozog, a to pri zmene polohy tela. (Trojan 2003)

### 2.4.2 Metabolická regulácia

Mechanizmus je fylogeneticky najstarší, najjednoduchší a najsplošhlivejší. Udržuje rovnováhu medzi metabolickými potrebami orgánu a krvným prietokom. Kyslík je nutný pre zaistenie metabolizmu a metabolity pôsobia na hladký sval ciev buď priamo alebo cez endoteliálne receptory a s nimi spojenou produkciou NO, čo má vplyv na tonus ciev.

Inou formou je enzymatická regulácia, ktorá je typická pre žľazy. Bunky žliaz tvoria kallikreín, ktorý štiepi plazmatický protein kininogén. Uvoľnený kallidín je premenený na bradykinin, čo vyvolá vazodilatáciu. (Trojan 2003)



Obrázok č. 6 Produkcia NO v endoteli a jeho efekt na hladkú svalovinu ciev

Zdroj: <https://www.econicon.com/eccy/cardiology-ECCY-01-00003.php>

### 2.4.3 Pomalé (dlhodobé) riadiace mechanizmy

Tieto mechanizmy pôsobia na krvný obeh pomocou riadenia celkového objemu krvi. Patrí sem efekt množstva tekutiny vylúčenej obličkami, mechanizmus pomocou vazopresínu a regulácia aldosterónom. Vazopresín je antidiuretický hormón, ktorý vyvoláva vazokonstrikciu a zvyšuje spätnú resorpciu vody v tubuloch obličky. Aldosterón je hormón produkovaný v kôre nadobličiek v zona glomerulosa a zvyšuje spätnú resorpciu  $\text{Na}^+$  a vody. Takisto zvyšuje citlivosť hladkého svalstva cievy na angiotenzín II, čím posiluje RAAS (systém renín-angiotenzín-aldosterón). (Trojan 2003)

### 2.4.4 Nervové regulačné mechanizmy

Nervové regulačné mechanizmy patria spolu s hormonálnymi medzi rýchle riadiace systémy. Sú fylogeneticky mladšie a celkovo zložitejšie. Ich hlavnou úlohou je udrženie stáleho krvného tlaku. Riadené sú centrálné to znamená, že ponechajú danému orgánu minimálnu anatómiu. Typické sú pre orgány, ktoré sa diferencovali pre danú funkciu. Príkladom takéhoto orgánu je koža. Vegetatívny nervový systém umožní tieto mechanizmy pomocou sympatiky.

Výraznú inerváciu majú obličky, kostrové svaly, útrobný nerv a arterioly kože. Hlavným mediátorom je noradrenalín, ktorý spôsobuje vazokonstrikciu. Napriek tomu, v niektorých orgánoch sa uplatňuje i vazodilatačný účinok cholinergných zakončení parasympatiky, napríklad vo vonkajšom genitálnom orgáne.

Medzi dôležité nervové mechanizmy patria cievne reflexy. Receptory monitorujú aktuálny krvný tlak a pomocou aferentných dráh podávajú informácie do vazomotorických centier. Pokyny do srdca a hladkých cievnych svalov sú prenesené eferentnými dráhami. Baroreceptorové reflexy patria do tej skupiny. Umiestnené sú vo veľkých tepnách hlavne v oblúku aorty a v karotickom sinuse. Monitorujú napätie steny danej tepny. Pokles tlaku spôsobuje zníženie napätia steny artérie a znižuje aktivitu baroreceptorov. Ten reflex zvýši sympatickú aktivitu cez nervové zakončenia, zvýši periferný odpor a srdečnú aktivitu, a tak zachová normálny krvný tlak.

Ďalšie reflexy pôsobiace na srdcovú činnosť a krvný tlak sú podávané pomocou predsieňových receptorov. Reagujú hlavne na zvýšené aktívne napätie pri zvýšenom tlaku v predsieni pri systole a na zvýšené pasívne napätie pri zvýšenom krvnom tlaku v predsieni na konci systoly a začiatkom diastoly komory.

Na riadenie krvného obehu majú efekt i periferné a centrálné chemoreceptory, ktoré reagujú na zmeny parciálneho tlaku kyslíka,  $\text{CO}_2$  a na zmeny pH. (Trojan 2003)

### 2.4.5 Hormonálne regulačné mechanizmy

Najdôležitejšie katecholamíny pôsobiace na periferné cievy pomocou adrenergných receptorov sú adrenalín a noradrenalín. Adrenergné receptory sa delia na  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  a  $\beta_2$ . Receptory typu  $\alpha_2$  v obehovej sústave sa nenachádzajú.  $\alpha_1$  receptory sú prítomné hlavne v hladkej svalovine rezistenčných ciev, napríklad v obličkách, koži a splachníke v miestach sympatickej inervácie. Adrenergné receptory typu  $\beta_1$  sa nachádzajú v srdci a  $\beta_2$  v cievach, a to väčšinou v kosternom svalstve a vo venčitých tepnách.

Aktivácia  $\alpha_1$  receptorov spôsobuje vazokonstrikciu, kým  $\beta_2$  vazodilatáciu. Mediátor noradrenalín má vplyv len na  $\alpha$  receptory a spôsobuje vazokonstrikciu. Katecholamín adrenalín aktivuje  $\alpha$  i  $\beta$  receptory. V miestach, kde sú hlavne receptory typu  $\alpha$  vyvolá vazokonstrikciu, ale pôsobením na  $\beta$  receptory spôsobuje vazodilatáciu. Na aktiváciu  $\beta$  receptorov stačí jeho menšia koncentrácia ako na aktiváciu receptorov typu  $\alpha$ . Adrenalín pôsobením na  $\beta$  receptory vyvoláva zníženie celkového periferného odporu a ovplyvneným  $\alpha$  i  $\beta$  receptorov súčasne redistribúciu minútového srdcového objemu. Mimochodom, adrenalín má vplyv aj na činnosť myokardu a spôsobuje zvýšenie minútového objemu, ale krvný tlak nemení. Noradrenalín pri tom jedine zvýši periferný odpor, a tým zároveň aj krvný tlak. (Trojan 2003)

Na hranici medzi rýchlymi a pomalými regulačnými mechanizmami je RAAS. Pomocou RAAS sa do riadenia krvného tlaku sa zapoja aj obličky. Renín je hormón produkovaný juxtaglomerulárnym aparátom a má funkciu enzýmu, ktorý štiepi plazmatickú bielkovinu angiotenzinogén na angiotenzín I. Ten je angiotenzinogén konvertujúcim enzýmom premenený na angiotenzín II. Vzniknutý oktapeptid má silný vazokonstrikčný účinok na rezistenčné cievy a stimuluje sekréciu aldosterónu. Ten zvýši absorpciu  $\text{Na}^+$  a intravaskulárny objem. Spúšťačím faktorom pre ten mechanizmus je pokles prietoku krvi obličkami. Ak klesne krvný tlak vo vas afferens, začne sa renín vylučovať vo vysokých dávkách. Vazopresín, uvoľnený z hypofýzy, ovplyvní spätné vstrebávanie vody zo zberných kanálikov nefrónov, čím reguluje objem telových tekutín a krvného tlaku tým pádom. Vo vysokých dávkach vyvolá vazokonstrikciu tepničiek.

Opačný efekt má atriálny nátriuretický peptid. Je vylučovaný srdcovými predsieňami v dôsledku napätia steny zvýšeným žilným návratom. Hormón antagonizuje pôsobenie rôznych vazokonstrikčných látok a znižuje krvný tlak. (Trojan 2003)

## 2.5 Flavonoidy

Flavonoidy sú zlúčeniny, ktoré sa vyskytujú v prírode vo veľkom množstve v rôznych formách a ich efekt na ľudský organizmus sa líši v závislosti na type zlúčeniny. (Vita 2005) Patria medzi fenolové prírodné zlúčeniny, ktoré majú protektívne vlastnosti voči patogénom, UV-žiarením a bylinožravcom.

Flavonoidy, deriváty 2-fenylchromanu, obsahujú dva aromatické kruhy, ktoré vznikajú kondenzáciou cynamoylkoenzýmu A s malonylkoenzýmom A. Najprv vznikne chalkón a ten prechádza na typ flavánonový alebo izoflavónový. Delia sa na flavonoly, flavanony, flavanoly, flavóny, izoflavonoidy, anthokyanídy, chalkóny a dihydroflavonoly. (Higdon et al. 2016)

Do organizmu se môžu dostať vo forme glykozidov alebo vo forme aglykónov. Biodostupnosť flavonoidov závisí na forme, napríklad aglykóny sú čiastočne vstrebané v žalúdku ale glykozidické formy nie sú. (Crespy et al. 2002) Flavonoidy sú vo všeobecnosti hydrofilné zlúčeniny s nízkou hodnotou logP a molekulovou hmotnosťou, preto sa transport cez bunkové membrány uskutoční pomocou špeciálnych transportných proteínov. Izoflavonové aglykóny cez  $\beta$ -glykozidickú väzbu pripojené na glukózu pomocou hydroxylovej skupiny. Táto väzba je hydrolyzovaná pomocou laktázy a glykozidázy v tenkom čreve. Vzniknuté aglykony sú pasívnou difúziou absorbované. (Čvorovič et al. 2018)

V živom organizme sú zapojené do oxidačne-redukčných procesov odsávaním voľných radikálov a chelatovaním redox-aktívnych iónov. Vlastnia vysoko reaktívne hydroxylové skupiny, ktoré sú výborné elektrónové donory a efektívne vychytávajú superoxidové anióny, peroxyinitrit a NO. Oxidovaním voľných radikálov vznikajú stabilnejšie zlúčeniny a menej reaktívne radikály. (Higdon et al. 2016)

Majú schopnosť normalizovať permeabilitu kapilár, odstraňovať ich lámavosť a pôsobia antihemoragicky, antiedematózne. Okrem toho sú inhibítormi hyaluronidázy a bránia rozširovaniu mikrobiálnych toxínov. Niektoré pôsobia diureticky, rozširujú cievy, znižujú krvný tlak, bránia zrážaniu krvi a potencujú účinok vitamínu C. (Tomko et al. 1999)

Niektorí zástupci (apigenín, chrysin) sa selektívne viažu k benzodiazepinovým receptorom a kvôli tomu majú i anxiolytické vlastnosti. (Babu et al. 2009)

Napríklad resvetratol. Katechíny spomalia starnutie mozgu, znížia riziko vývoja Alzheimer, Parkinsonovej choroby a riziko stroku. Okrem toho majú vazodilatačné vlastnosti. (Galíego et al. 2014)

Polyfenolické sekundárne metabolity, izoflavonoidy, sú v poslednej dobe skúmané okrem iného pre svoje vazodilatačné schopnosti. Ich kardioprotektívny účinok sa dá pripisovať ich antioxidantným, antiageragačným a lipidy znižujúcim efektom a podpurujú endoteliálne funkcie. Flavonoidy uplatnia antiagregačný účinok spomalením uvoľnenia kyseliny arachidonovej a tromboxán syntázy, čo inhibuje formovanie tromboxánu A<sub>2</sub>. Majú vplyv pravdepodobne na príjem cholesterolu a iných tukov cez enterocyty. Ovpływnia absorpciu tukov, luminálnu hydrolýzu a intracelulárny transport. Znížia transkripciu génu syntázy lipidov cez epidermálny rastový faktor receptor/fosfatidylinozitol-3-kináza, transdukčné spojenie a aktivitu acetyl CoA karboxylázy inhibujú. (Gallego et al. 2014)

Izoflavonoidy sú štruktúrne podobné 17β-estradiolu, čo vyvsvetluje ich afinitu k estrogénovým receptorom. Fytoestrogény, ako napríklad daidzeín a genisteín, interagujú s estrogénovými receptormi a znížia riziko karcinómu prs. Ovpływňujú aj ženský reprodukčný systém. Niektoré izoflavonoidy inhibujú aromatázu, znižujú biosyntézu estrogénu a majú antiestrogénový efekt. Ten je dôležitý pri liečbe rakoviny prostaty a prs. (Higdon et al. 2016)

### 2.5.1 Biochanín A

Prírodné sa vyskytuje v sóje fazuľovej (*Glycine max, Fabaceae*) a ďateline lúčnej (*Trifolium pretense, Fabaceae*). Má nízku rozpustnosť vo vode a nízku bioavibilitu. Je rýchlo metabolizovaný na glukoronidy a sulfáty v pečeni a v črevách, čo je hlavným dôvodom jeho nízkej biodostupnosti. (Raheja et al. 2018)

Biochanín A je 4-methyl derivát genisteínu, ktorý má antiproliferatívne a protizápalové vlastnosti tým, že inhibuje fosfodiesterázu 4. Je to dôležitý antioxidant. Chráni bunky pred oxidatívnym stresom a inhibuje expresiu a aktivitu invázivných enzýmov. Biochanín A môže potlačiť osteosarkóm, pretože ovplyvňuje rôzne fázy bunkového cyklu. (Luo et al., 2019) Protektívny efekt má na dopaminergné neuróny a stimuluje osteoblasty.

Bolo dokázané, že vyvolá relaxáciu koronárnych ciev a vazorelaxáciu. Indukovaná relaxácia spôsobená biochanínom A je nezávislá na endoteli a asi ovplyvňuje priamo hladkú svalovinu. Nemá vplyv na syntézu NO a na relaxáciu navodenú týmto mediátorom. (Choi et al. 2014)

Draslíkové kanály kontrolujú v endoteli a v hladkej svalovine arteriálny krvný tlak a cievny tón. Podľa niektorých štúdií, biochanín A aktivuje ATP-senzitívne draslíkové kanály a vápnikom aktivované draslíkové kanály. To je asi dôvodom jeho vazorelaxačnej aktivity. Aktivácia týchto kanálov a hyperpolarizácia bunkovej membrány v hladkej svalovine inhibuje  $Ca^{2+}$  influx cez napäťovo riadené vápenaté kanály a tým aktiváciu draslíkových kanálov. Táto relaxácia je koncentračne závislá. (Choi et al. 2014)

Vazodilatácia je vyvolaná látkami produkovanými endotelom, ktoré majú otvoriť napäťovo riadené a  $Ca^{2+}$  iónom aktivované kanály v hladkej svalovine. EDHF cez draslíkové kanály v hladkej svalovine aktivuje iónové kanály, čo spôsobí svalovú hyperpolarizáciu, a tým pádom vazorelaxáciu. (Choi et al. 2014)

### **3 Ciel' práce**

Overiť možné mechanizmy vazorelaxačného účinku biochanínu A metodami *ex vivo* na izolovanej aorte potkana Wistar.

1. Je účinok biochanínu A závislý na prítomnosti intaktného endotelu?
2. Má biochanín A vplyv na  $\text{Ca}^{2+}$  influx blokádou L-typu membránových  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov?
3. Má biochanín A účinky nezávislé na extracelulárnom  $\text{Ca}^{2+}$ ?

## **4 Experimentálna časť**

### **4.1 Zvieratá a použitý materiál**

#### **4.1.1 Pokusné zvieratá**

K pokusu boli použité potkany kmeňa Wistar s priemernou hmotnosťou  $450 \pm 20$  g, ktoré boli pred testovaním aklimatizované vo viváriu Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové. Boli kŕmené peletizovanou potravou a mali voľný prístup k pitnej vode. Manipulácia a ustajnenie zvierat, rovnako ako samotný pokus, prebiehli v súlade so zákonom č.246/1992 Sb. O ochrane zvierat proti týraniu a so súhlasom Etickej komisie Farmaceutickej fakulty Univerzity Karlovej v Hradci Králové.

#### **4.1.2 Prístroje a pomôcky**

1. Aparatúra na izolované časti aorty a vyhodnocovací software (Experimentia Ltd, Budapest, Hungary)
2. Laboratorné sklo, lyžička, mikropipety
3. Laboratorné váhy (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Germany)
4. Operačné náradie: operačný stolec, nôžky, peán, pinzety
5. Plynová bomba s pneumoxidom (zmes 95% a 5%CO<sub>2</sub>)
6. Program na vyhodnotenie výsledkov GraphPad Prism version 6.



### 4.1.3 Použité chemikálie

Tabuľka č. 1: Chemikálie pre prípravu Krebsovho živného roztoku:

| <u>Názov látky</u>                         | <u>Vzorec</u>  | <u>MW</u>     | <u>Výrobca</u>   |
|--|--|---------------|--|
| <u>Chlorid sodný p.a.</u>                  | <u>NaCl</u>  | <u>58,44</u>  | <u>Penta Chrudím, Česká republika</u>                    |
| <u>Chlorid draselný p.a.</u>               | <u>KCl</u>   | <u>74,56</u>  | <u>Lachema Brno, Česká republika</u>                     |
| <u>Hydrogenuhličitan sodný p.a.</u>        | <u>NaHCO<sub>3</sub></u>                                       | <u>84,01</u>  | <u>Penta Chrudím, Česká republika</u>                    |
| <u>Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.</u> | <u>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></u>                            | <u>136,09</u> | <u>RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česká republika</u> |
| <u>Síran horečnatý heptahydrát p.a.</u>    | <u>MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</u>                        | <u>246,47</u> | <u>Lachema Brno, Česká republika</u>                     |
| <u>D-glukóza monohydrát p.a.</u>           | <u>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O</u> | <u>198,17</u> | <u>Penta Chrudím, Česká republika</u>                    |
| <u>Chlorid vápenatý bezvodý p.a.</u>       | <u>CaCl<sub>2</sub></u>  | <u>110,99</u> | <u>Lachema Brno, Česká republika</u>                     |

**Tabl'ka č. 2: Ostatné chemikálie:**

| <u>Názov látky</u>                             | <u>Vzorec</u>   | <u>MW</u>     | <u>Výrobca</u>                |
|--|---|---------------|-------------------------------|
| <u>Noradrenalín bitartarát monohydrát p.a.</u> | <u>C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>.C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O</u> | <u>337,28</u> | <u>Sigma-Aldrich, Nemecko</u> |
| <u>Nitroprussid sodný dihydrát p.a.</u>        | <u>Na<sub>2</sub>[Fe(CN)<sub>5</sub>NO].H<sub>2</sub>O</u>  | <u>297,95</u> | <u>Sigma-Aldrich, Nemecko</u> |
| <u>Acetylcholín jodid p.a.</u>                 | <u>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>N(I)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub></u>                    | <u>273,1</u>  | <u>Sigma-Aldrich, Nemecko</u> |
| <u>Dimethylsulfoxid</u>                        | <u>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO</u>   | <u>78,13</u>  | <u>Sigma-Aldrich, Nemecko</u> |
| <u>Uretán</u>                                  | <u>C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>2</sub></u>   | <u>89,03</u>  | <u>Sigma-Aldrich, Nemecko</u> |
| <u>Fenylefrín</u>                              | <u>C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub></u>  | <u>167,21</u> | <u>Sigma-Aldrich, Nemecko</u> |
| <u>Bay K8644</u>                               | <u>C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub></u>                              | <u>356,3</u>  | <u>Sigma-Aldrich, Nemecko</u> |
| <u>Biochanín A</u>                             | <u>C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub></u>  | <u>284,26</u> | <u>Sigma-Aldrich, Nemecko</u> |

#### **4.1.4 Anestézia**

Roztok uretánu 20mg/100ml.

## 4.2 Metodika

### 4.2.1 Príprava Krebsovho roztoku

Zloženie:

| Substancie                          | Koncentrácia (g/l) |
|-------------------------------------|--------------------|
| Chlorid draselný p.a.               | 0,35               |
| Chlorid sodný p.a.                  | 5,54               |
| Hydrogenuhlíčan sodný p.a.          | 2,1                |
| Chlorid vápenatý bezvodý p.a.       | 0,28               |
| Síran horečnatý heptahydrát         | 0,29               |
| Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. | 0,16               |
| D-glukóza monohydrát p.a.           | 2,1                |

Látky uvedené v tabuľke sme postupne navážili a samostatne rozpustili v malom množstve destilovanej vody. Potom pripravené roztoky zmiešali. Roztok chloridu vápenatého bol pridaný až na konci, aby sa predišlo vyzrážaniu slabo rozpustných vápenatých solí. Na konci sme pripravený roztok doplnili na predpísaný objem destilovanou vodou.

#### 4.2.2 Príprava testovanej látky

Testovaná látka, biochanín A, bola rozpustená v DMSO (dimethylsulfoxid) tak aby koncentrácia biochanínu A bola  $10^{-2}$  M. Na požiadajú koncentráciu bol ďalej riedený Krebsovým živným roztokom.

#### 4.2.3 Príprava experimentu

K experimentu bola použitá metodika izolovaných cievnych krúžkov z hrudnej aorty samice potkana Wistar.

Na začiatku experimentu bola podaná k anestézii zvierat'u intraperitoneálnou injekciou uretánu (1,2g/kg).

Pokusné zviera v hlbkej anestézii zafixovalo na operačný stolík a po pridaní heparínu intravenózne (*v.saphena*) vykrcavalo. Po roztrhnutí kožnej riasy v oblasti hrudníka sa tupou preparáciou sa vyňala thorakálna časť aorty. Získaná asi dvojcentimetrová časť aorty bola prenesená do Petriho misky s pripraveným Krebsovým živným roztokom o pH7,4. Cieva bola kompletne očistená od zvyškov tukového, spojivového tkaniva, krvi a nastrihaná na 2-3mm dlhé kruhové segmenty.

Pripravené aortálne kruhy boli zavesené na držiak tkaniva pomocou háčkov z nerezovej ocele do pripravených Schulerových nádobiek. Aparatúra bola vytemperovaná na 37°C, prepláchnutá, naplnená živným roztokom (5ml) a k zaisteniu prežitia tkaniva saturovaná pneumoxidom (95% O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>). Prevodník bol spojený s počítačom, ktorý bol vybavený špeciálnym softwarom ( S.P.E.L. Advanced Kymograph Software) pomocou čoho sa zisťovala relaxácia alebo kontrakcia pripraveného vzorku.



Obrázok č. 7 Aparatúra na izolované časti aorty s vyhodnocovacím softwarom

#### **4.2.4 Stabilizácia a záťaž**

Pred pokusmi prebiehla vždy stabilizácia pomocou záťaže. Pripravený preparát bol zatŕažený hmotnosťou 2g a stabilizovaný 45 minút. Počas stabilizácie každých 10 minút bol Krebsov živný roztok vymenený za čerstvý. Po vypršaní toho intervalu do aparatúry bol aplikovaný presný objem 5ml Krebsovho roztoku a po stabilizácii krivky na zázname bol preparát pripravený na testovanie.

## **4.2.5 Závislosť účinku biochanínu A na prítomnosti intaktného endotelu**

### **4.2.5.1 Testovanie kontraktility a funkcie endotelu**

Pred umiestnením do aparátúry boli niektoré aortálne kruhy opatrne zbavené endotelu. Na vyvolanie kontrakcie bol do preparátu pridaný NA (noradrenalín) (výsledná koncentrácia  $1\mu\text{M}$ ), kde bola stabilizovaná približne 30 minút. Na testovanie prítomnosti endotelu sa pridal ACH (acetylcholín) (výslednou koncentráciou  $10^{-4}$  M). V prípade nenarušeného endotelu došlo k relaxácii cievy, kruhy bez endotelu na ACH nereagovali. Potom Krebsov živný roztok bol vymenený niekoľkokrát aby došlo k vymytiu prítomného NA a ACH. Preparát sa nechal znovu stabilizovať.

### **4.2.5.2 Experiment**

Po stabilizácii bol do preparátu opäť pridaný NA k vyvolaniu submaximálnej kontrakcie (finálna koncentrácia bola  $10^{-5}$  M). Po ustálenej odpovedi na NA boli do kúpela kumulatívne pridaný s postupne rastúcou koncentráciou biochanín A (finálna koncentrácia  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M).

## 4.2.6 Ca<sup>2+</sup>-influx vs uvoľnenie zo sarkoplazmatického retikula

### 4.2.6.1 Testovanie kontraktility a funkcie endotelu

Počas experimentu boli použité aortálne kruhy bez endotelu. Po stabilizácii aparatury bol do Krebsovho živného roztoku pridaný KCl (koncentrácia vo vodnej kúpeli 60 mM), čo indukovalo kontrakciu. Potom bol Krebsov živný roztok vymenený niekoľkokrát, aby došlo k odstráneniu KCl. Preparát sa nechal znovu stabilizovať a bol pridaný NA (finálna koncentrácia v chembru bola 1μM), ktorý indukoval kontrakciu. Prítomnosť endotelu sa testovalo pridaním ACH (výsledná koncentrácia 10<sup>-4</sup> M) podobne ako v predošlom pokuse.

Následne bol Krebsov živný roztok vymenený za Krebsov roztok s obsahom EDTA a bez Ca<sup>2+</sup> iónov (výsledná koncentrácia EDTA 0,1 mM). EDTA je chelatačné činidlo, ktoré vychytá prítomné Ca<sup>2+</sup> ióny z aparatury. Po opätovnej stabilizácii bol pridaný KCl (výsledná koncentrácia 40mM) na testovanie prítomnosti Ca<sup>2+</sup> iónov. V prípade kontrakcie (=prítomnosť vápenatých ionóv) sa pokračovalo vymývaním pomocou Krebsovho živného roztoku s EDTA a bez Ca<sup>2+</sup> iónov. Následne bol Krebsov živný roztok bez Ca<sup>2+</sup> a s EDTA nahradený Krebsovým roztokom bez Ca<sup>2+</sup> iónov a preparát sa nechal opäť stabilizovať.

### 4.2.6.2 Experiment

Po stabilizácii bol znovu pridaný KCl (koncentrácia v kúpeli bola 40 mM). Následne bol pridaný biochanín A a po 20 minútovej inkubácie aortálnych krúžok so skúmanou látkou bol kumulatívne pridaný s postupne rastúcou koncentráciou fenylefrín (finálna koncentrácia bola 10<sup>-9</sup> – 10<sup>-5</sup>M). Ten vyvolal postupnú kontrakciu aortálnych kruhov. Biochanín A bol testovaný v oddelených pokusoch v troch rôznych koncentráciach: 3.10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M a 3.10<sup>-5</sup>M.

## **4.2.7 Vtok $\text{Ca}^{2+}$ vs blokácia $\text{Ca}^{2+}$ kanálov L-typu**

### **4.2.7.1 Testovanie kontraktility a funkcie endotelu**

K pokusu boli použité aortálne kruhy s endotelom. Po stabilizácii preparátu na vyvolanie kontrakcii, ako test funkčnosti, bol pridaný do Krebsovho živného roztoku KCl (koncentrácia vo vodnej kúpeli 60 mM). Následne bol Krebsov živný roztok vymenený niekoľkokrát, aby došlo k odstráneniu KCl. Aparatúra sa opäť stabilizovala a bol pridaný NA (koncentrácia v chambru bola 1  $\mu\text{M}$ ), ktorý indukoval kontrakciu. Celistvosť endotelu sa opäť otestovalo pridaním ACH (výsledná koncentrácia  $10^{-4}$  M). Preparát bol potom viackrát vymytý Krebsovým roztokom a stabilizovaný.

### **4.2.7.2 Experiment**

Po vymývaní Krebsovým živným roztokom a stabilizácii bol dodaný KCl (15mM v kúpeli). Vyvolaná kontrakcia sa stabilizovala a následne bol pridaný biochanín A. Po 20 minútovej inkubácii aortálnych kruhov so skúmanou látkou kumulatívne sa pridával Bay K 8644, ktorý vyvolal postupnú kontrakciu vzoriek ( finálna koncentrácia  $10^{-9}$  –  $10^{-5}\text{M}$ ). Na záver bol pridaný KCl (60mM), ktorý vyvolal maximálnu kontrakciu aortálnych kruhov. Biochanín A bol testovaný v oddelených pokusoch v troch rôznych koncentráciách:  $3 \cdot 10^{-6}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$  a  $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$ .

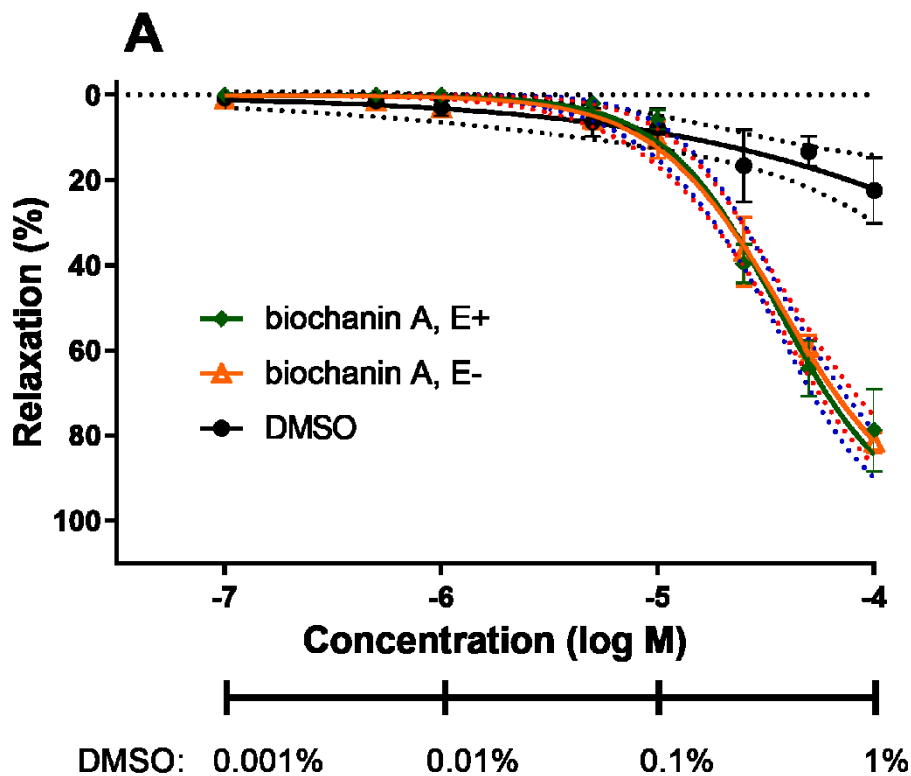


#### 4.2.8 Štatistická analýza

Získané výsledky boli vyhodnotené pomocou počítačového programu GraphPad Prism5. Relaxácie tkaniva bola prepočítané na percentá z maximálnej relaxácie (pokusy na vplyv endotelu) a/alebo vyjadrená ako percentá účinku KCl, NA alebo v absolútnych číslach (ostatné pokusy). Metódou nelineárnej regresie boli zostrojené CRC krivky (závislosť percentuálnej relaxácie aorty na logaritmickej koncentrácii skúšaných látok) a hodnoty  $EC_{50}$  (koncentrácia vyvolávajúca 50% maximálnej relaxácie či kontrakcie). Pre štatistické porovnanie sa použili hodnoty  $EC_{50}$  a 95% konfidenčné intervaly. Na zostrojenie každej krivky boli použité najmenej tri aortálne krúžky z najmenej dvoch potkanov.

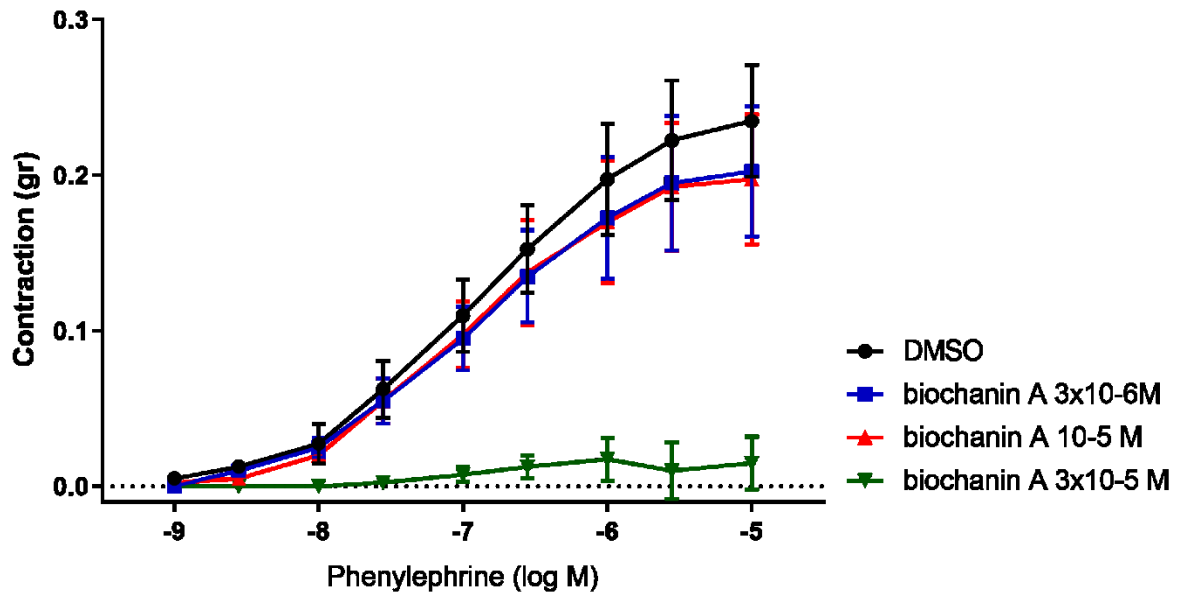
## 5 Výsledky

### Závislosť účinku biochanínu A na prítomnosť intaktného endotelu

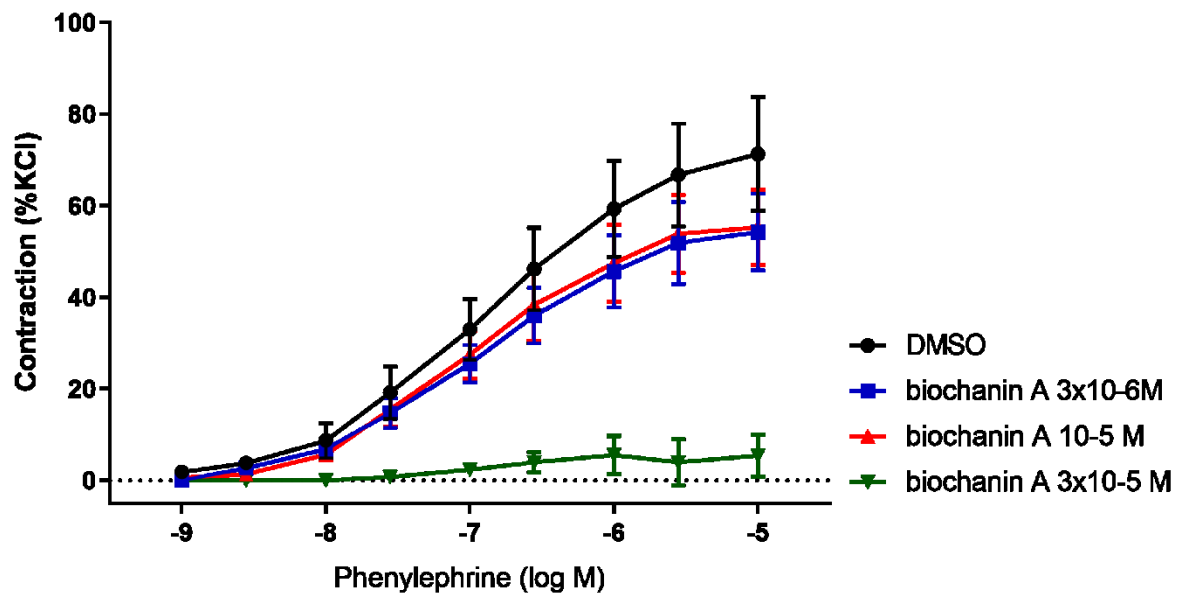


Graf č. 1: Krivky Koncentrácia-odpoveď, s 95% konfidenčnými intervalmi, ukazujú vazokonstrikčný účinok BayK 8644 v prítomnosti rôznych koncentrácií biochanínu A v aortálnych krúžkoch s neporušeným endotelom (E+, zelená čiara) alebo obnaženým endotelom (E-, oranžová čiara), prekontrahované norepinefrínom ( $10^{-5}$  M). Relaxácia je vyjadrená ako percento relaxácie indukovanej nitroprussidom sodným, priemer  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ . Krivka koncentrácia odpoveď rozpúšťadla bola použitá ako negatívna kontrola a výsledná koncentrácia DMSO v kúpleli je indikovaná na ose x.

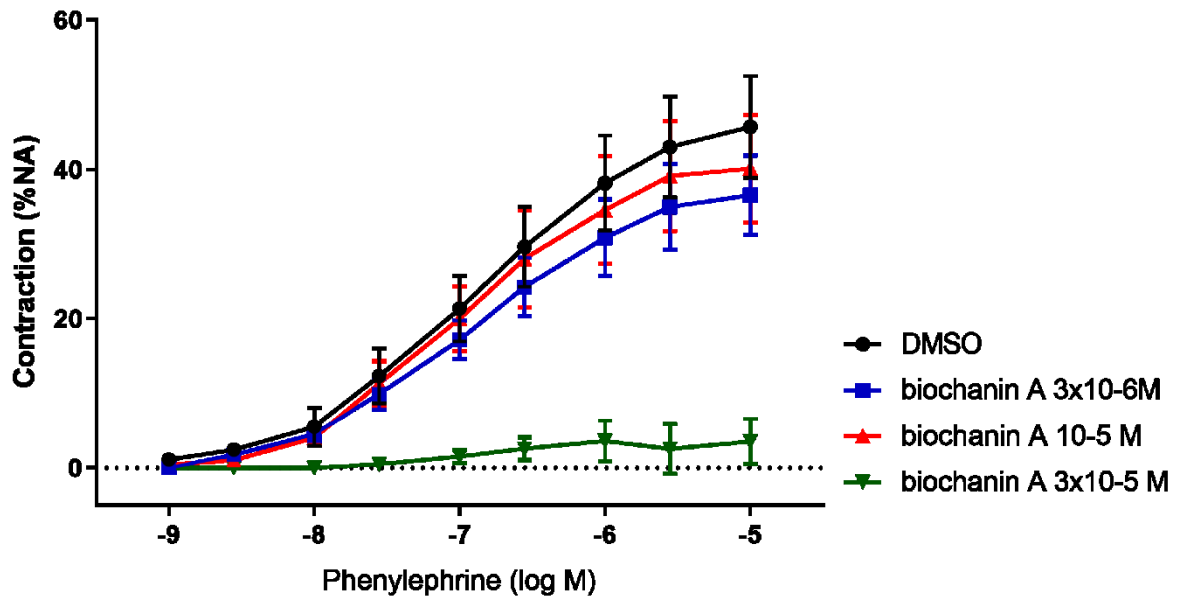
## Účinok biochanínu A nezávislý na extracelulárnom $\text{Ca}^{2+}$



Graf č. 2: Krivky Koncentrácia-odpoveď ukazujú vazokonstrikčný efekt fenylefrínu v prítomnosti troch rôznych koncentrácií biochanínu A v aortálnych krúžkoch s nefunkčným endotelom. Kontrakcia je vyjadrená v absolutných hodnotách (g), priemer  $\pm$  SEM. Krivka koncentrácia odpoveď samotného rozpúšťadla (bez biochanínu A) bola použitá ako negatívna kontrola.

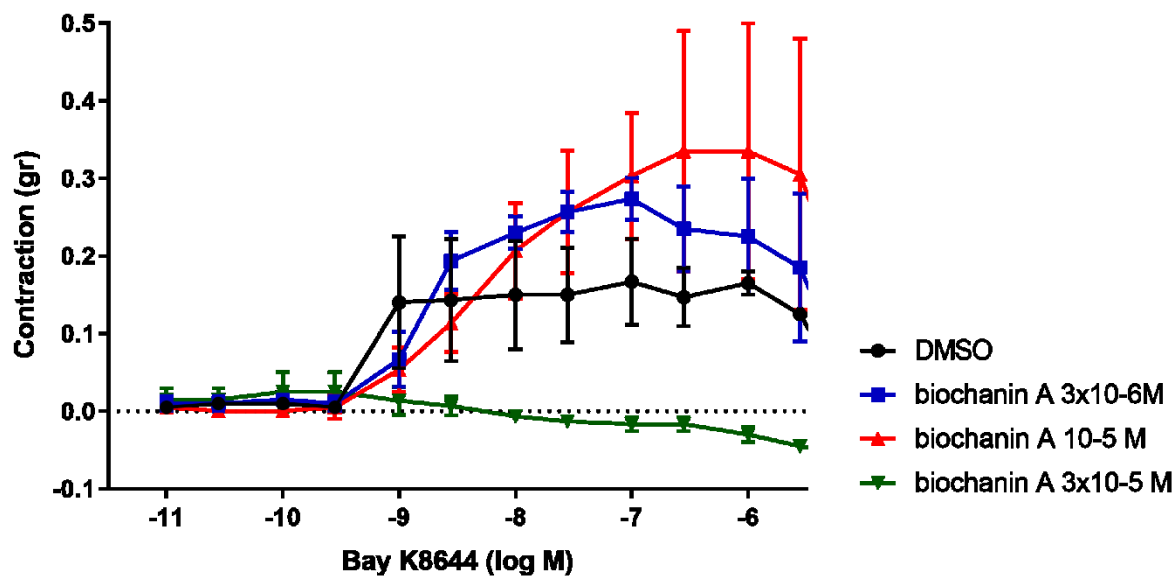


Graf č. 3: Krivky Koncentrácia-odpoveď ukazujú vazokonstrikčný efekt fenylefrínu v prítomnosti troch rôznych koncentrácií biochanínu A v aortálnych krúžkoch s nefunkčným endotelom. Kontrakcia je vyjadrená ako percento kontrakcie indukovanej KCl, priemer  $\pm$  SEM. Krivka koncentrácia-odpoveď samotného rozpúšťadla (bez biochanínu A) bola použitá ako negatívna kontrola.

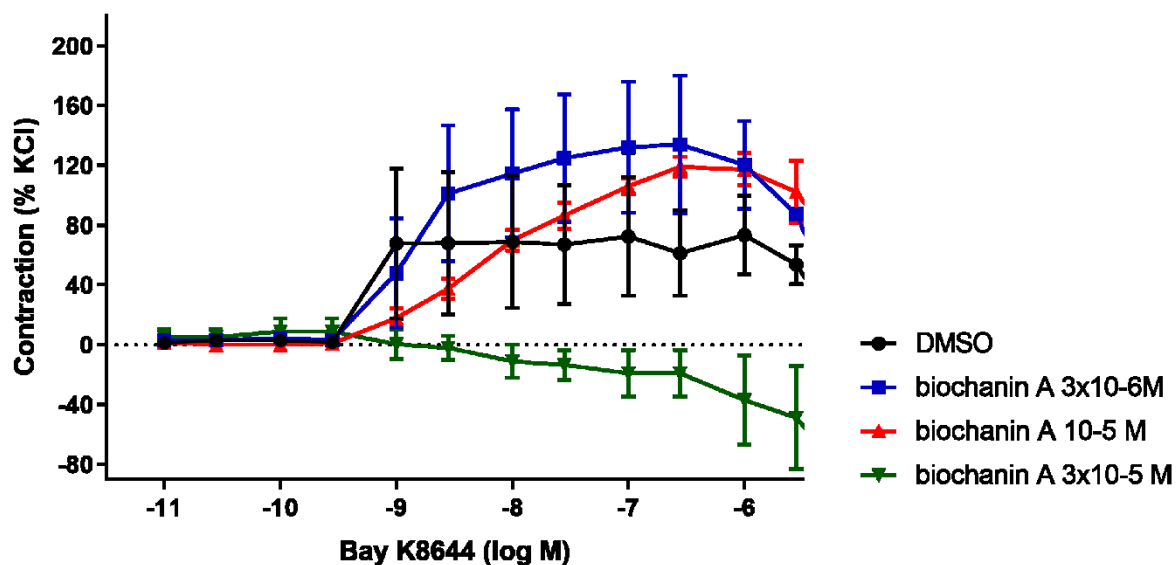


Graf č. 4: Krivky Koncentrácia-odpoveď ukazujú vazokonstrikčný efekt fenylefrínu v prítomnosti troch rôznych koncentrácií biochanínu A v aortálnych krúžkoch s nefunkčným endotelom. Kontrakcia je vyjadrená ako percento kontrakcie indukovanej noradrenalínom, priemer  $\pm$  SEM. Krivka koncentrácia odpoveď samotného rozpúšťadla (bez biochanínu A) bola použitá ako negatívna kontrola.

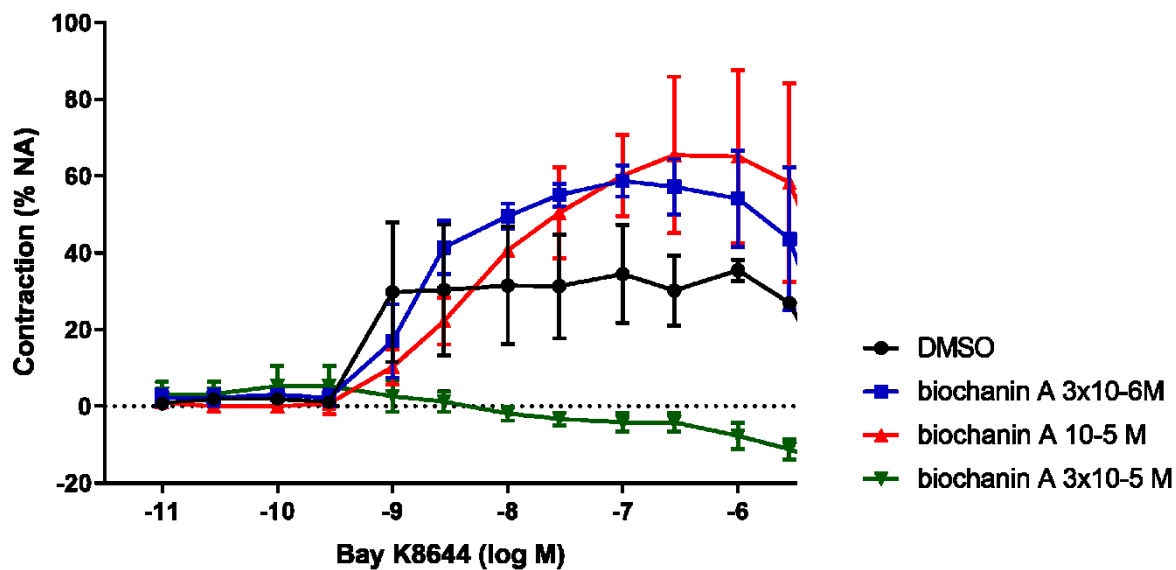
## Vplyv biochanínu A na $\text{Ca}^{2+}$ influx blokádou L-typu membránových $\text{Ca}^{2+}$ kanálov



Graf č. 5: Krivky Koncentrácia-odpoveď ukazujú vazokonstričný účinok BayK 8644 v prítomnosti rôznych koncentrácií biochanínu A v aortálnych krúžkoch s intaktným endotelom. Kontrakcia je vyjádrená v absolutných hodnotách (g) priemer  $\pm$  SEM. Krivka koncentrácia odpoveď rozpúšťadla (bez biochanínu A) bola použitá ako negatívna kontrola.



Graf č. 6: Krivky Koncentrácia-odpoveď ukazujú vazokonstrikčný účinok BayK 8644 v prítomnosti rôznych koncentráciách biochanínu A v aortálnych krúžkoch s intaktným endotelom. Kontrakcia je vyjadrená ako percento kontrakcie indukovanej KCl, priemer  $\pm$  SEM. Krivka koncentrácia odpoveď samotného rozpúšťadla (bez biochanínu A) bola použitá ako negatívna kontrola.



Graf č. 7: Krivky Koncentrácia-odpoveď ukazujú vazokonstrikčný účinok BayK 8644 v prítomnosti rôznych koncentrácií biochanínu A v aortálnych krúžkoch s intaktným endotelom. Kontrakcia je vyjadrená ako percento kontrakcie indukovanej noradrenalínom, priemer  $\pm$  SEM. Krivka koncentrácia odpoveď samotného rozpúšťadla (bez biochanínu A) bola použitá ako negatívna kontrola.



## 6 Diskusia

Arteriálna hypertenzia a ateroskleróza tepien patria medzi najčastejšie civilizačné choroby. Medzi najčastejšie príčiny patrí endotelová dysfunkcia, nerovnováha vazokonstrikčných a vazodilatačných látok, stres a samozrejme genetická predispozícia. (Silbernagl a Lang, 2001) Patrí medzi hlavné príčiny úmrtia celosvetovo, a preto sú vývoj nových efektívnych liečebných stratégií a prevencia podstatné. Dokážu znížiť mortalitu, morbiditu a náklady na liečbu.

V súčasnosti síce farmakoterápia dokáže efektívne regulovať krvný tlak, ale väčšina doteraz dostupných účinných látok má nežiadúce účinky. Každá z nich zaťažuje eliminačné orgány, či už obličky, alebo pečeň. Sú užívané väčšinou dlhodobo až doživotne, čo u pacientov spôsobuje non-compliance.

Pravdepodobne je to jedným z hlavných dôvodov, prečo si ľudia hľadajú iné metódy liečby týchto chorôb. Pacienti si v poslednej dobe často si vyberú fytomedicínu alebo alternatívnu medicínu namiesto chemickej liečby. Ten záujem je čiastočne oprávnený a prírodné látky sú v súčasnosti čoraz viac hlavným predmetom výskumu. Napríklad polyfenolické zlúčeniny sú skúmané pre svoje pozitívne účinky na kardiovaskulárny systém okrem toho, že sú aj fytoestrogény. (Knox et al. 2019)

K týmto látkam patrí i biochanín A. Jeho účinky boli testované *ex vivo* na izolovaných aortálnych krúžkoch. Vo všetkých pokusoch sa potvrdilo, že biochanín A vyvolá dávково závislú vazorelaxáciu. Hlavným cieľom tejto práce bolo overiť niekoľko možných mechanizmov vazorelaxačného účinku.

### 6.1 Závislosť vazorelaxačného účinku biochanínu A na prítomnosti intaktného endotelu

Endotel má okrem ochrannej aj veľmi komplexné parakrinné, endokrinné a autokrinné funkcie. Endotelové bunky sú zapojené do rôznych fyziologických funkcií napr. do zápalových procesov, angiogenézy, hemostázy, metabolizmu,...atď.. Majú dôležitú barierovú funkciu, pretože podporujú aktívnu transvaskulárnu difúziu. Myoendotelový kontakt, medzi endotelovými bunkami a svalovými bunkami umožní šírenie nervového vzruchu a prechod iónov, malých molekúl a cyklických nukleotidov. (Ketonen 2010)

Endotel má dvojitú funkciu pri kontrole vaskulárneho tónu. Uvoľňuje nie len vazodilatačné látky (NO, PGI, EDHF) ale aj vazokonstrikčné (ET-1, angiotenzín II, tromboxan A, prostaglandín, superoxid). Vazokonstrikcia i vazodilatácia tak prebiehajú pomocou viac navzájom prepojených mechanizmov.

Počas vazokonstrikcie dochádza k zúženiu ciev, čím sa reguluje odpor obehového systému. Vazokonstriktory môžu pôsobiť cez fosfolipázu C, IP<sub>3</sub> a DAG, IP<sub>3</sub>R na SR, kalmodulín a MLCK. Dôležitým komponentom tých zložitých intracelulárnych kaskád je Ca<sup>2+</sup>.

Stupeň MLC fosforylácie je regulovaný G-proteínom spojeným s rôznymi signálnymi dráhami a NO. Aktivácia G<sub>q</sub>-proteínu látkami napr. adrenalin, angiotenzín II, endotelín-1 a vazopresín stimuluje uvoľnenie Ca<sup>2+</sup> zo SR a aktiváciu Rho-kinázy. To následne inhibuje MLC fosfatázu a spôsobuje kontrakciu. Aktivácia alfa<sub>2</sub>-adrenoreceptorov noradrenlínom (spojený s G<sub>i</sub>-proteínom) zníži tvorbu cAMP a zvýši aktivitu MLCK.

Regulačné deje sú navzájom značne previazané, ako je vidieť z niekoľkých nasledujúcich prípadoch.

Napríklad endotelín-1 je silne účinný vazokonstrikčný peptid vznikajúci v endoteli. Viaže sa na receptor ET<sub>A</sub> v bunkách vazkulárneho svalu. Aktivuje fosfolipázu C, ktorá hydrolyzuje fosfatidylinozitol- 4,5- bisfosfát na IP<sub>3</sub> a DAG. Ten zvýši intracelulárnu koncentráciu Ca<sup>2+</sup> a dochádza k častému otváraniu vápenatých kanálov L-typu. Okrem vazokonstrikcie ET-1 má ale vplyv aj na vazodilatáciu. Stimuluje endotelínový receptor ET<sub>B</sub>, čo aktivuje tvorbu NO a PGI<sub>2</sub> a následne vazodilatáciu. (Ketonen 2010)

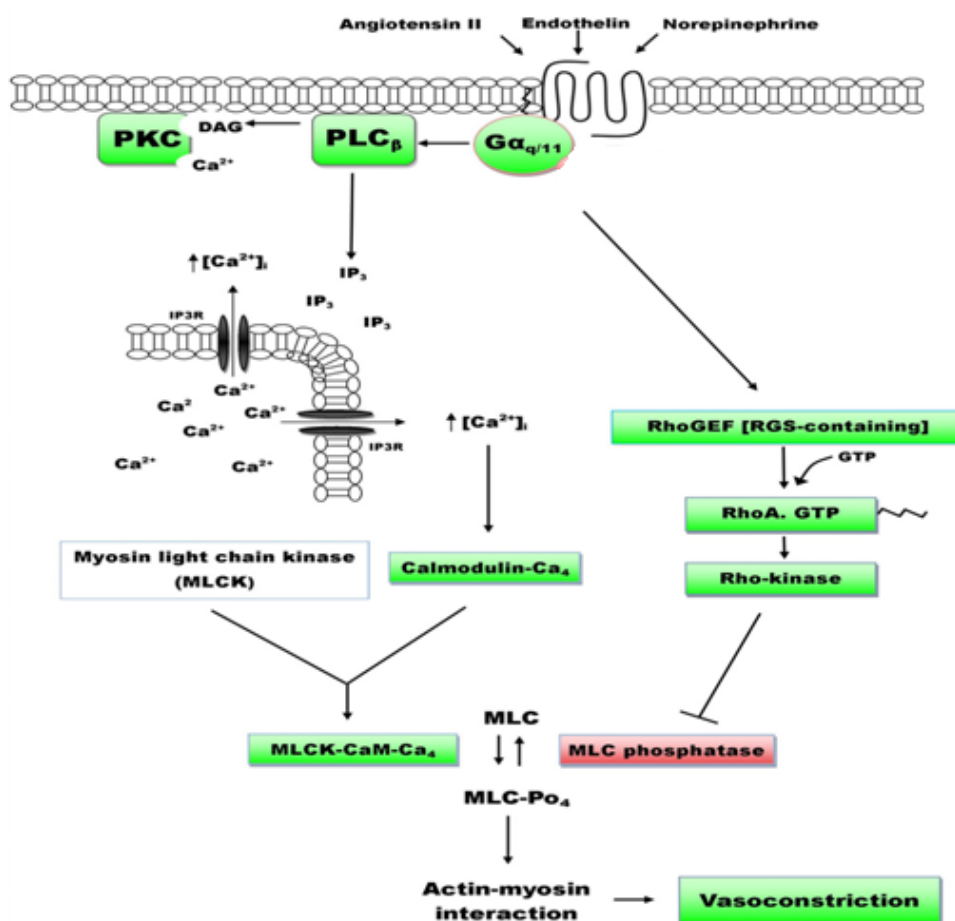
Na povrchu endotelu je uložený aj vazokonstrikčný enzým ACE, ktorý je aktivovaný angiotenzínom II a inaktivovaný bradykinínom, ktorý ovplyvní i syntézu ET-1. Vazokonstrikčný vplyv angiotenzínu II je sprostredkovaný cez AT<sub>1</sub> receptory v hladkej svalovine. Podporuje konstriktciu aj produkciou voľných kyslíkových radikálov pomocou prostanoidov. Má vplyv i na receptory typu AT<sub>2</sub>, ktoré sa nachádzajú v endoteli a majú opačný efekt. (Stennet et al. 2009)

Prostaglandín H<sub>2</sub>, tromboxan A<sub>2</sub> sú signálne molekuly formované z arachidonovej kyseliny bunkovej membrány pomocou rôznych enzýmov: cyklooxygenáza, fosfolipáza A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> syntáza. Existujú 2 izoformy COX: COX-1 sa vyskytuje konštitutívne, kým COX-2 je indukovaná prozápalovými cytokínmi. (Zhou et al. 2005) Aktivujú rôzne signálne dráhy,

ktoré regulujú kontrakciu, agregáciu a produkciu adhezívnych molekúl. Tromboxan sa viaže na tromboxan-prostaglandínový receptor  $A_2$  ( $TPR_{\alpha}$ ), ktorý je spojený s G-proteínom. Ten aktivuje AC a dochádza k zvýšenej tvorby cAMP. Naopak AC je inhibovaná pôsobením tromboxan-prostanoídového receptoru beta.

Vazopresín je peptid tvorený v hypotalame. Primárna funkcia toho peptidu je regulácia objemu telových tekutín. V obličkách pôsobí cez  $V_2$  receptory zvýšené spätné vstrebávanie vody zo zberných kanálikov nefrónov. To zvýši krvný tlak, srdcový výdaj a objem krvi. Okrem toho má vazokonstričný efekt. V hladkej svalovine ciev sa viaže na  $V_1$  receptory a pôsobí cez  $IP_3$  a ROCK signálnu dráhu čo zvýši krvný tlak. (Richard, 2016)

Noradrenalin spôsobuje vazokonstrikciju VSMC (vascular smooth muscle cell) cez  $\alpha_1$ -adrenergne receptory. Sú to receptory spojené s G-proteínmi. Po naviazaní agonistu dochádza k aktivácii fosfolipázy C a  $A_2$ . Influx  $Ca^{2+}$  potrebuje dlhotrvajúcu aktiváciu, a to pravdepodobne pomocou tyrozínkinázy a PCK. Ten receptor aktivuje tiež  $Ca^{2+}$  influx, a to cez napät'ovo riadené  $Ca^{2+}$  kanály. (Piascik a Perez, 2001)



Obrázok č. 8 Účinok vazokonstriktorov (Basti et al., 2011)

Podobne vazodilatácia je veľmi komplexný dej. Vazodilatácia je spôsobená relaxáciou VSMC. Vazodilatátory zvýšia prietok krvi a snižujú krvný tlak. Vyvolajú defosforyláciu myozínu a to buď znížením intracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$  alebo pomocou ROCK. Relaxácia hladkej svaloviny sa nastane pri zníženej fosforylácii MLC. To môže byť spôsobená: 1) zníženým uvoľnením  $\text{Ca}^{2+}$  zo SR alebo blokáciou vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do bunky, 2) inhibíciou MLCK spôsobenej zvýšenou koncentráciou cAMP 3) defosforyláciou MLCK spôsobenej fosfatázou.

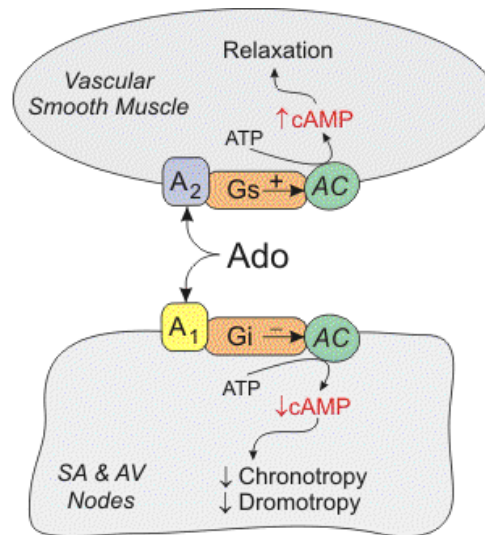
Významným vazorelaxačným pôsobkom je oxid dusnatý, ktorý vyvolá krátku relaxáciu ciev. NO stimuluje guanylátcyklázu, ktorá následne vyvolá tvorbu cGMP (cyklický guanozínmonofosfát). Vzniknutý cGMP aktivuje PKC a ten môže ovplyvniť hladinu  $\text{Ca}^{2+}$  rôznymi mechanizmami: inhibuje uvoľnenie  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárnych zdrojov, zabraňuje tvorbu  $\text{IP}_3$ , inaktivuje  $\text{Ca}^{2+}$  kanály L-typu, facilituje  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výmenník, podporuje priamo a nepriamo otvorenie  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentných  $\text{K}^+$  kanálov, ktoré vedú k hyperpolarizácii membrány a inaktivácii  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov L-typu alebo fosforyluje fosfolamb čo aktivuje ATP-ázu v SR. Následný pokles koncentrácie  $\text{Ca}^{2+}$  iónov zaistí blokáciu MLCK spôsobujúcu relaxáciu hladkého svalstva cievy. (Ketonen 2010, Ignarro et al., 1987)

Hyperpolarizujúci faktor (EDHF), derivovaný z endotelu, má významnú úlohu v endoteli závislej relaxácii rezistentných artérií. Sú to bioaktívne látky produkované a uvoľnené endotelom, vyvolajúce vazodilatáciu hyperpolarizáciou plazmatickej membrány a aktiváciou rôznych  $\text{K}^+$  kanálov v hladkej svalovine. Tie kanály sú  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ,  $\text{K}_{\text{ATP}}$ ,  $\text{K}_{\text{ir}}$ ,  $\text{K}_{\text{v}}$ . (Ko et al. 2008) Látky ako napr.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , CO, NO a epoxyeikosatrienové kyseliny aktivujú  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . (Félétou 2009)

Okrem toho vazodilatácia môže byť vyvolaná aj látkami adenosín, prostacyklín. Tieto látky sú spojené s G-proteínom a zvýšia cAMP, ktorý inhibuje MLCK.

Adenosín je prirodzene sa vyskytujúci purinový nukleozid. Vzniká z ATP, ktorý je primárne energetická zásoba pre transportné systémy a enzýmy. V hladkej svalovine sa viaže na adenosínový receptor ( $\text{A}_{2\text{a}}$ ) a ten je spojený s G-proteínom. Aktivácia stimuluje adenylátcyklázu, čím sa zvýši tvorba cAMP a dôjde k aktivácii proteinkinázy. Dochádza k stimulácii  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -kanálov, čo hyperpolarizuje hladkú svalovinu a navodí relaxáciu. Zvýšená hladina cAMP spôsobí relaxáciu inhibíciou MLCK. Adenosín inhibuje aj influx  $\text{Ca}^{2+}$  cez napät'ovo riadené vápenaté kanály L-typu. Ten je dôležitým komponentom počas kontrakcie a jeho znížená koncentrácia spôsobuje vazodilatáciu. Adenosín v niektorých cievach vyvolá vazodilatáciu cez cGMP, čo inhibuje vtok  $\text{Ca}^{2+}$  a otváranie K kanálov. (Richrad, 2012)

V kardiomyocytoch sa viažu na adenozinové receptory typu A<sub>1</sub>. Tie sú spojený s G<sub>i</sub>-proteínom aktivácia tejto signálnej dráhy otvorí K-kanály, čo hyperpolarizuje bunky. Okrem toho zníži tvorbu cAMP, čo inhibuje aj vápenaté kanály L-typu. Má teda negatívny chrono- a dromotropný efekt na srdcovú činnosť. (Richrad, 2012)



Obrázok č. 9 Účinok adenozinu v hladkej svalovine ciev a v srdci

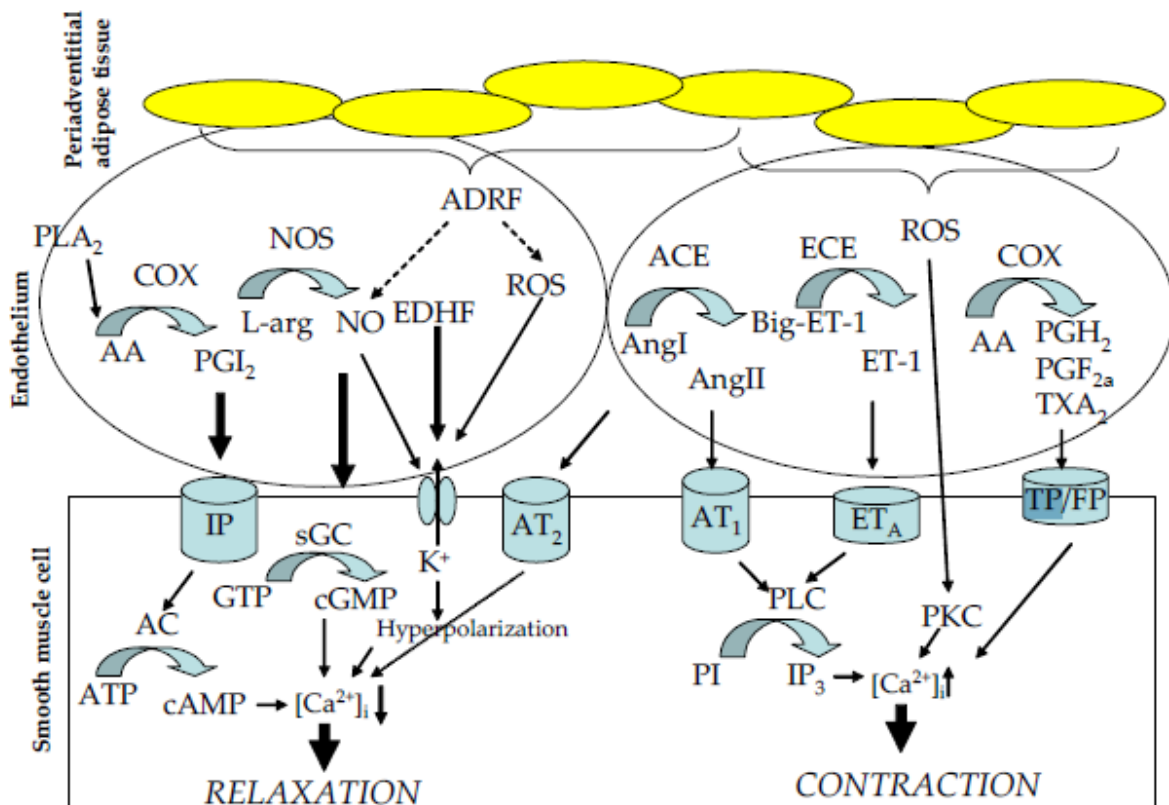
Zdroj: <https://www.cvpharmacology.com/antiarrhy/adenosine>

Ďalší vazodilatátor tvorený endotelom, PGI<sub>2</sub>, je produkt metabolizmu arachidonovej kyseliny. Stimuluje prostacyklínové receptory v hladkej svalovine ciev, ktoré patria do skupiny receptorov spojených s G-proteínmi. Spôsobuje tvorbu cAMP, ktorý má niekoľko vazodilatačných účinkov: 1) fosforyluje PAK, ktorá inhibuje MLCK, 2) stimuluje odstraňovanie Ca<sup>2+</sup> z cytosolu, 3) stimuluje ATP-senzitívne K<sup>+</sup> kanály a spôsobuje hyperpolarizáciu bunkovej membrány. (Ketonen 2010)

Účinné látky ako napríklad inhibitory ACE, ACH, vazodilatátory pôsobiace cez tvorbu cAMP vyvolajú vazodilatáciu závislú na endoteli. (Wolfgang et al. 1993, Kvernmo et al. 1999, Schäfer et al. 2003)

V tejto práci bola testovaná úloha endotelu pri vazodilatácii vyvolanej biochanínom A. Počas pokusov boli porovnané reakcie aortálnych krúžkov, a to intaktných alebo zbavených endotelu. Ukázalo sa (vid.obr.č.1), že reagujú totožne a navodená relaxácia je preto veľmi pravdepodobne nezávislá na prítomnosti funkčného endotelu. Účinok na cievy nezávislý na endoteli je relatívne bežný. Podobne nezávislé sú vazokonstrikčný adrenalín a noradrenalín, vazodilatačne účinný papaverín a nepriame donátory NO (glyceroltrinitrát, isosorbiddinitrát)

vo vysokých koncentráciach. Z prírodných látok napr. izochinolínové (tetrandrín) a diterpenové (mezakonitín) alkaloidy, spôsobia tiež vazodilatáciu nezávislú na endoteli (tieto látky pravdepodobne blokujú vstup  $\text{Ca}^{2+}$  cez vápenaté kanály L-typu). Podobným mechanizmom fungujú deriváty kyseliny fталovej (ligustlid, senkyunolid), seskviterpény a flavonoidy (skutelarín, farrerol, chrysin, apigenín, luteolín). Polyfenoly (resveratrol, kvertecín) majú priamy a aj nepriamy vazodilatačný efekt. (Knox et al.2019, DeFeudis 1985)



Obrázok č. 10 Produkcia vazodilatátorov a kontraktálnych faktorov v endoteli a ich efekt na vazkulárny tón (Ketonen, 2010)

## 6.2 Vplyv biochanínu A na $\text{Ca}^{2+}$ influx blokádou L-typu membránových $\text{Ca}^{2+}$ kanálov

Membránové vápenaté kanály L-typu sa prevažne nachádzajú v bunkovej membráne hladkej svaloviny ciev, kardiomyocytoch, sinoatriálnom uzle a atrioventikulárnom uzle. Majú vysokú vodivosť a pomalú napät'ovo ovládanú inaktiváciu. Napät'ovo ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  kanály spôsobujú krátky ale intenzívny nárast  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrácie. Sú zodpovedné za reguláciu vtoku  $\text{Ca}^{2+}$ , čo je dôležitý druhý posol podialajúci sa na rôznych bunčných procesoch. Otváranie týchto kanálov vyvolá influx extracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$  a uvoľnenie zo SR pomocou RYRs a  $\text{IP}_3\text{R}$ .

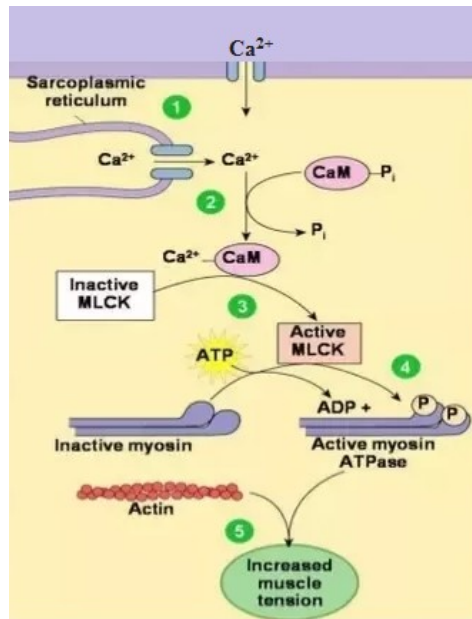
Tie receptory sú schopné uvoľniť  $\text{Ca}^{2+}$  zo SR, ktorý je indukovaný  $\text{Ca}^{2+}$ . Nárast cytozolickéj koncentrácie  $\text{Ca}^{2+}$  iniciuje mobilizáciu ďalšieho  $\text{Ca}^{2+}$  zo SR, ale keď je prekročená určitá hranica koncentrácie, vyvíja sa negatívna spätná väzba a kanály sa zatvoria. (Bootman a Berridge, 1996)

RyR kanály sú lokalizované blízko plazmatickej membrány. Druhé posle cADP ribóza a PAK zväčšujú citlivosť k  $\text{Ca}^{2+}$ , ale PKC znižuje. (House et al., 2008) RyR sú schopné zvýšiť koncentráciu  $\text{Ca}^{2+}$  a vytvoriť tzv.  $\text{Ca}^{2+}$  iskry, ktoré aktivujú  $\text{Ca}^{2+}$ -ovládané  $\text{K}^+$  kanály. Lokálne zvýšenie intracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$  plynie z otvorenia RyR kanálov v membráne SR, čo vedie k hyperpolarizácii spôsobenej otvorením  $\text{K}^+$  kanálov. (Nelson et al., 1995) Takže  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  kanály sú aktivované nie len nárastom koncentrácie  $\text{Ca}^{2+}$ , ale aj depolarizáciou.

$\text{IP}_3$  po naviazaní na  $\text{IP}_3\text{R}$  spôsobuje konformačnú zmenu a otvorenie kanálu, a tým vstup  $\text{Ca}^{2+}$  zo SR do cytoplazmy. Ten difunduje cytosolom a otvára ďalšie  $\text{Ca}^{2+}$  kanály. V prípade úbytku  $\text{Ca}^{2+}$  zo SR dochádza ku konformačnej zmene  $\text{IP}_3\text{R}$ , a to umožní vstup extracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$ . (Berridge, 1997)

Ionizovaný vápnik sa viaže na regulačný proteín, kalmodulín, a vzniká kalcium-kalmodulínový komplex. Ten aktivuje MLCK, ktorý fosforyluje myozín a dochádza k interakcii aktínu s myozínom. Blokáda vstupu tohto iónu spôsobuje vazodilatáciu a má negatívny chronotropný, dromotropný a inotropný efekt na srdce. Pri zníženej koncentrácii  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazme je aktivovaný enzým MLCP, ktorý deaktivuje ATP-ázovú aktivitu myozínových hláv. Týmto zanikajú mostky medzi ľahkými a ťažkými filamentmi a hladký sval postupne relaxuje. (Fernández et al. 2015, Richard 2015, McNeish et al. 2010) Koncentrácia cytozolického  $\text{Ca}^{2+}$  je regulovaná pumpami ( $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áza plazmatickej membrány,  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-áza sarko/endoplazmatického retikula ) a výmenníkmi ( $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ ). (Berra-Romani et al., 2008)

$\text{Ca}^{2+}$  ATP-áza sarko/endoplazmatického retikula je pumpa, ktorá pomocou ATP transportuje  $\text{Ca}^{2+}$  z cytosolu do retikula, a tým udržiava  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázu. Aktivita tej pumpy je regulovaná fosforyláciou a defosforyláciou fosfolambu. Fosfolamban je substrátom cGMP-dependentnej proteínkinázy a reguluje vazodilatáciu. (Lucas et al., 2000, Koss a Kranias, 1996, Lompre, 1998)



Obrázok č. 11 Úloha  $\text{Ca}^{2+}$  pri vazokonstrikcii v hladkej svalovine

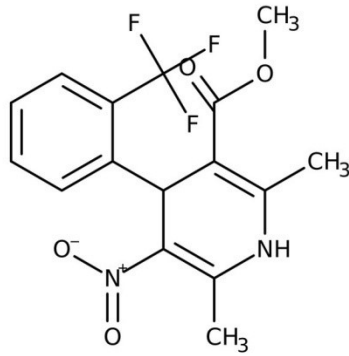
Zdroj: <https://www.quora.com/What-is-the-mechanism-of-action-of-diltiazem>

V našej práci sme chceli zistiť, či je biochanín A blokátorom L-typu membránových vápenatých kanálov. K tomuto účelu sme použili BayK 8644. BayK 8644 je analóg nifedipínu, 1,4-dihydropyridinový derivát, a agonista napäťovo riadených vápenatých kanálov L-typu. V jeho prítomnosti sa zvýši prietok  $\text{Ca}^{2+}$  iónov cez tieto kanály a predlžuje sa ich otváranie.

BayK má i ďalšie účinky.  $\text{Ca}^{2+}$  ióny sú uvoľnené tiež zo SR. (Thomas et al. 1985) Taktiež má pozitívny inotropný efekt na srdce a ten nie je spôsobené inhibíciou  $\text{Na,K-ATP-ázy}$  alebo kvôli zvýšenej citlivosti vlákien k  $\text{Ca}^{2+}$ . Pravdepodobne vyvolá i uvoľnenie NO z buniek kvôli NOS, ktorá je regulovaná pomocou systému kalcium/kalmodulín. (Berkels et al. 1999)

V pokusoch s izolovanou cívou Bay K 8644 vyvolá kontrakciu, ktorá je závislá na koncentrácii. Jeho účinok sa dá antagonizovať pomocou  $\text{Ca}^{2+}$  antagonistov (nifedipín, verapamil) alebo odstránením  $\text{Ca}^{2+}$  iónov zo živného roztoku. (Salaices et al. 1988) V tejto práci sme testovali vplyv troch rôznych koncentrácií biochanínu A na účinok BayK 8644. Ukázalo sa, že biochanín A dokáže v najvyššej použitej koncentrácii úplne zablockovať vplyv BayK8644. Preto je pravdepodobné, že blokuje L-typ vápenatých kanálov ako napr. nifedipín. Ďalej je pravdepodobné, že tento účinok je dávkovo závislý.





Obrázok č. 12 Vzorec BayK 8644

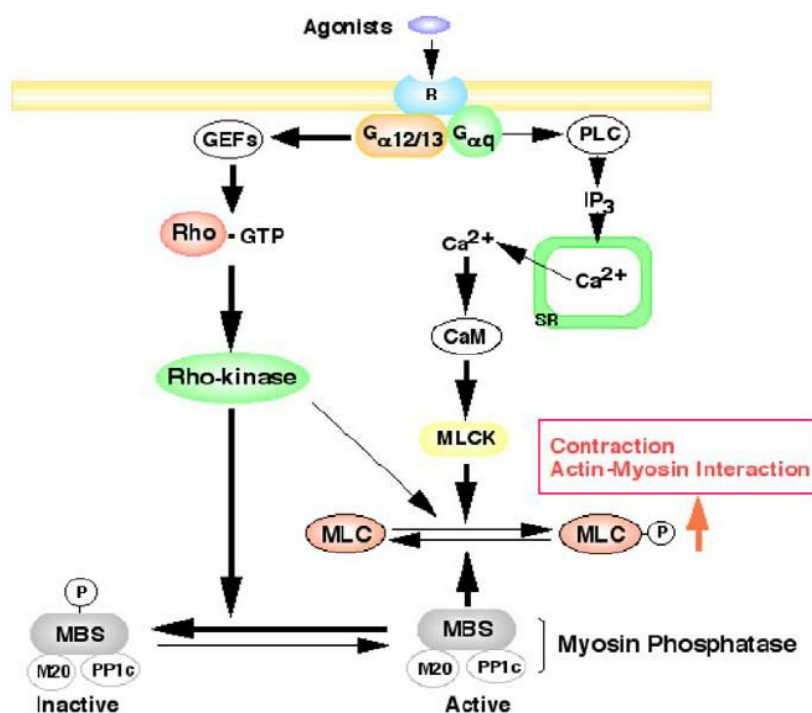
Zdroj: <https://www.fishersci.se/shop/products/bay-k-8644-6/15424079>

### 6.3 Účinok biochanínu A nezávislý na extracelulárnom $\text{Ca}^{2+}$

I keď blokáda  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov je pravdepodobne hlavný mechanizmus vazodilatačného účinku biochanínu A, stále platí, že vazodilatácia môže prebiehať i nezávisle na vstupe extracelulárneho vápnika.

Pre overenie tohto mechanizmu účinku sme sa rozhodli vyskúšať účinky biochanínu A v prostredí bez vápniku. Podmienkou úspešného pokusu bolo preto dôkladné odvápnenie. K tomuto účelu sme použili opakované premytie Krebsovým roztokom, ktorý obsahoval EDTA. Odstránenie  $\text{Ca}^{2+}$  sme overili pomocou KCl.

K samotnému pokusu sme ako vazokonstrikčnú látku použili fenylefrín a porovnali jeho účinky v prítomnosti troch rôznych koncentrácií biochanínu A. Fenylefrín je alfa1-agonista. Po aktivácii alfa1-receptorov dôjde v bunke k rôznym dejom a konečným výsledkom je vazokonstrikcia. Alfa1-adrenegné receptory sú spojené s Gq-proteínmi a spôsobujú vazokonstrikciu cez IP3 signálnu dráhu. Gq-proteíny v hladkej svalovine sú spojené s 2 signálnymi dráhami: kaskáda fosfolipázy C (inozitol trifosfát) a Rho-kinázová.



Obrázok č. 13 Mechanizmus účinku alfa<sub>1</sub>-agonisty

Zdroj: [https://www.researchgate.net/figure/Regulation-of-smooth-muscle-contraction-by-Rho-kinase-and-myosin-phosphatase-downstream\\_fig3\\_226193646](https://www.researchgate.net/figure/Regulation-of-smooth-muscle-contraction-by-Rho-kinase-and-myosin-phosphatase-downstream_fig3_226193646)

Zatiaľ sú známe tieto intracelulárne mechanizmy: cez IP<sub>3</sub> je stimulované uvoľnenie Ca<sup>2+</sup> zo SR, ktoré aktivujú PKC cez tvorbu DAG. PKC vyvolá influx extracelulárneho Ca<sup>2+</sup>. ROCK (Rho-kinázová dráha) inhibuje myozínovú fosfatázu MLCP a zväčší kontrakciu. Cez Gq-proteíny pôsobia i ďalšie vazokonstrikčné látky, napr. angiotenzín II, ET-1, adrenalín, noradrenalín a vazopresín. Kaskáda ich účinku môže byť rovnaká alebo podobná. (Klabunde 2018, Jeong et al. 2015)

V tejto práci sme chceli zistiť, či biochanín A dokáže vyvolať vazorelaxáciu nezávislú na extracelulárnom vápniku. Zo získaných výsledkov vyplýva, že vazodilatácia je vyvolaná i bez prítomnosti extracelulárneho vápnika. Najvyššia testovaná koncentrácia biochanínu A dokázala vyvolať najsilnejšiu vazodilatáciu, takže účinok je pravdepodobne dávkovo závislý. Zo získaných výsledkov nie je možné určiť presný mechanizmus účinku. Z doteraz známych mechanizmov účinku fenylefrínu pripadajú do úvahy blokácia uvoľnenia intracelulárneho Ca<sup>2+</sup> zo SR a/alebo inhibícia ROCK, ktorá by tak menej inhibovala MLCP a dochádzalo by k odštiepeniu fosfáty z ľahkého myozínového reťazca a následne k inhibícii svalovej kontrakcie.

## 7 Záver

Práca sa zamerala na analýzu biochanínu A v *in vitro* podmienkach. Experimenty boli realizované na izolovaných aortálnych kruhov potkana, ktoré potvrdili jeho vazodilatačnú aktivitu. Biochanín A spôsobil dávkovo závislú vazodilatáciu na prekontraahovaných kruhov.

Mechanizmus účinku biochanínu A bol skúšaný na cievach s endotelom aj bez endotelu. Zo skúmania mechanizmu účinku vyplýva, že vazodilatačný účinok biochanínu A je nezávislý na prítomnosti endotelu.

Biochanín blokoval L-tyt vápenatých kanálov podobne ako napríklad nifedipín, a tento účinok bol dávkovo závislý. Biochanín A bol aj v prostredí bez  $\text{Ca}^{2+}$  schopný znížiť kontrakciu vyvolanú fenylefrínom v závislosti na dávke.

Tento účinok preto sprostredkoval mechanizmus alebo mechanizmy, ktoré sú nezávislé na influxe extracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$ . Presný mechanizmus nie je na základe týchto výsledkov možné určiť. Do úvahy prichádza napr. inhibícia uvoľnenia intracelulárneho  $\text{Ca}^{2+}$  zo SR a/alebo inhibícia ROCK.

## 8 Zoznam skratiek

|                    |  |
|--------------------|--|
| ACH                | acetylcholín                                 |
| ACE                | angiotenzín-konvertujúci enzým               |
| ATP                | adenozíntrifosfát                            |
| AP                 | akčný potenciál                              |
| DAG                | diacylglycerol                               |
| DMSO               | dimethylsulfoxid                             |
| cAMP               | cyklický adenosínmonofosfát                  |
| cGMP               | cyklický guanosínmonofosfát                  |
| PDGF               | dostičkový rastový faktor                    |
| ER                 | endoplazmatické retikulum                    |
| EDHF               | endoteliálny hyperpolarizacný faktor         |
| EGF                | endoteliálny rastový faktor                  |
| ET-1               | endotelín                                    |
| ECM                | extracelulárny matrix                        |
| G <sub>q</sub> PCR | receptor spojený s G <sub>q</sub> -proteínom |
| G <sub>s</sub> PCR | receptor spojený s G <sub>s</sub> -proteínom |
| PIP <sub>3</sub>   | fosfatidylinozitol 3-kináza                  |
| IP <sub>3</sub>    | inozitol-trifosfát                           |
| MLCK               | kináza ľahkého reťazca myozínu               |
| NA                 | noradrenalin                                 |
| NO                 | oxid dusnatý                                 |

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| CO <sub>2</sub>  | oxid uhličitý                       |
| NOS              | NO-syntáza                          |
| PKC              | proteinkináza C                     |
| PKA              | proteinkináza A                     |
| KCl              | chlorid draselný                    |
| RAAS             | system renín-angiotenzín-aldosterón |
| SR               | sarkoplazmatické retikulum          |
| Ca <sup>2+</sup> | vápenatý ión                        |
| VEGF             | vaskulárny rastový faktor           |
| VSMC             | vascular smooth muscle cell         |

## 9 Zoznam použitej literatúry

1. Babu, P. V. A., Liu, D. (2009). Flavonoids and Cardiovascular Health. *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*, 371–392.
2. Bastin, G., & Heximer, S. P. (2011). Intracellular regulation of heterotrimeric G-protein signaling modulates vascular smooth muscle cell contraction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 510(2), 182–189.
3. Berra-Romani, R., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M. V. & Golovina, V. A. (2008). Ca<sup>2+</sup> handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295, C779-C790.
4. Berkels, R., Mueller, A., Roesen, R., & Klaus, W. (1999). Nifedipine and Bay K 8644 Induce an Increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and Nitric Oxide in Endothelial Cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 4(3), 175–181.
5. Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Physiology-London*, 499, 291-306.
6. Bootman, M. D., Berridge, M. J. (1996). Subcellular Ca<sup>2+</sup> signals underlying waves and graded responses in HeLa cells. *Current Biology*, 6, 855-865.
7. Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16, 521-555.
8. Čihák R. *Anatomie 3*. 2. vyd. Praha: Grada, 2002:832. ISBN 80-7169-140-2.
9. Čvorović, J., Zibera, L., Fornasaro, S., Tramer, F., Passamonti, S. (2018). Bioavailability of Flavonoids: The Role of Cell Membrane Transporters. *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease*, 295–320.

10. DeFeudis, F. V. (1985). Mechanism of endothelium-dependent vasorelaxation. *Medical Hypotheses*, 17(4), 363–374.
11. Félétou, M. (2009). Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options. *British Journal of Pharmacology*, 156(4), 545–562.
12. Fernández, J.A., McGahon, M.K., McGeown, J.G., Curtis, T.M. (2015) Cav3.1 T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels Contribute to Myogenic Signaling in Rat Retinal Arterioles. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* , 56, 5125-5132.
13. González-Gallego, J., García-Mediavilla, M. V., Sánchez-Campos, S., Tuñón, M. J. (2014). Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Properties of Dietary Flavonoids. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 435–452.
14. Haddy FJ, Vanhoutte PM, Feletou M. Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290: 546-52.
15. Higdon, J., Drake, J. V., Delage, B., Crozier, A. Flavonoids. 2016 Dostupné na URL: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids>. Prístup: 15.10.2019
16. House, S. J., Potier, M., Bisailon, J., Singer, H. A. & Trebak, M. (2008). The non-excitabile smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*, 456, 769-785.
17. Choi, S., Jung, W. S., Cho, N. S., Ryu, K. H., Jun, J. Y., Shin, B. C. Yeum, C. H. (2014). Mechanisms of phytoestrogen biochanin A-induced vasorelaxation in renovascular hypertensive rats. *Kidney Research and Clinical Practice*, 33(4), 181–186.
18. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric-oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 9265-9269.

19. Jeong Yuen Kim, Moo Yeol Lee, Hyoung Moo Park. (2015). The Effect of Eqoul, a Metabolite of Isoflavone, on Endothelial Cell-independent Vasodilatation of Human Uterine Artery In Vitro. *The Korean Society for Bone and Mineral Research*; 22(2):57-69.
20. Jordt, S.-E., Bautista, D. M., Chuang, H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Högestätt, E. D., ... Julius, D. (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427(6971), 260–265.
21. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Základy histologie*. 7. vydání. Jinočany: H & H, 1997:184–217, ISBN 80-85787-37-7.
22. Ketonen J, *Vascular dysfunction in diet-induced hypertension and obesity in mice*. University of Eastern Finland Dissertations in Health Sciences, 2010, 3-15 ISBN: 978-952-61-0188-0.
23. Khaled A. Abdel-Sater. *Pathophysiology of the Endothelium*. *EC Cardiology* 1.1 (2015): 17-26.
24. Konrádová V, Uhlík J, Vajner L. *Funkční histologie*. 2. vydání, Jinočany: H & H, 2000:115–126, ISBN 80-86022-80-3.
25. Ko, E. A., Han, J., Jung, I. D., & Park, W. S. (2008). Physiological roles of K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Smooth Muscle Research*, 44(2), 65–81.
26. Knox, M., Vinet, R., Fuentes, L., Morales, B., Martínez, J.L. (2019) A Review of Endothelium-Dependent and -Independent Vasodilation Induced by Phytochemicals in Isolated Rat Aorta. *Animals*, 9, 623.
27. Koss, K. L., Kranias, E. G. (1996). Phospholamban: A prominent regulator of myocardial contractility. *Circulation Research*, 79, 1059-1063.



28. Kvernmo, H. D., Stefanovska, A., Kirkebøen, K. A., Kvernebo, K. (1999). Oscillations in the Human Cutaneous Blood Perfusion Signal Modified by Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Vasodilators. *Microvascular Research*, 57(3), 298–309.
29. Lompre, A. M. (1998). The sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases in the cardiovascular system during growth and proliferation. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 8, 75-82.
30. Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P. & Waldman, S. A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*, 52, 375-413.
31. Luo Q, Shi X, Ding J, Ma Z, Chen X, Leng Y, Zhang X, Liu Y. (2019). Network Pharmacology Integrated Molecular Docking Reveals the Antiosteosarcoma Mechanism of Biochanin A. *Evid Based Complement Alternat Med*. 1410495.
32. Lüllman-Rauch R, *Histologie*. Praha: Grada, 2012, 102-216; 576, ISBN:978-80-247-3729-4.
33. McNeish, A. J., Altayo, F. J., & Garland, C. J. (2010). Evidence both L-type and non-L-type voltage-dependent calcium channels contribute to cerebral artery vasospasm following loss of NO in the rat. *Vascular Pharmacology*, 53(3-4), 151–159
34. Mikkelsen, E. O., Nyborg, N. C. B. (1986). Comparison of the Effects of the Vasoconstrictive Dihydropyridines BAY K 8644 and CGP 28392 on Isolated Rat Aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 8(3), 476–482.
35. Nathan R. Tykocki, Erika M. Boerman, William F. Jackson, Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. *Compr Physiol*. 2018 March; 7(2): 485–581.

36. Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J. & Lederer, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth-muscle by calcium sparks. *Science*, 270, 633-637.
37. Raheja, S., Girdhar, A., Lather, V., & Pandita, D. (2018). Biochanin A: A phytoestrogen with therapeutic potential. *Trends in Food Science & Technology*, 79, 55–66.
38. Richard E. Klabunde, PhD. Adenosine. (2012). Dostupné na URL: <https://www.cvpharmacology.com/antiarrhy/adenosine>. Prístup 18.12.2019
39. Richard E. Klabunde, PhD. Calcium-Channel Blockers (CCBs). 2015. Dostupné na URL: <https://www.cvpharmacology.com/vasodilator/CCB>. Prístup 24.11.2019
40. Richard E. Klabunde, PhD. Vascular Signal Transduction Mechanisms In: *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2018. Dostupné na URL: <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP011b>. Prístup 13.10.2019
41. Richard E. Klabunde, PhD. Vasopressin (Antidiuretic Hormone). 2016. Dostupné na URL: <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP016> . Prístup 18.12.2019
42. Pedersen, S. F., Owsianik, G., & Nilius, B. (2005). TRP channels: An overview. *Cell Calcium*, 38(3-4), 233–252.
43. Piasecki, M. T. & Perez, D. M. 2001. alpha(1)-adrenergic receptors: New insights and directions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298, 403-410.
44. Quayle JM, Dart C, Standen NB. The properties and distribution of inward rectifier potassium currents in pig coronary arterial smooth muscle. *J Physiol*. 1996; 494: 715-26.

45. Salaices, M., Alonso, M. J., Rico, I., Fernández-Alfonso, M. S., Marín, J. (1989). Vasoconstrictor effect of the Ca<sup>2+</sup> agonist Bay K 8644 on human cerebral arteries. *Brain Research*, 490(1), 133–140.
46. Schäfer, A., Burkhardt, M., Vollkommer, T., Bauersachs, J., Münzel, T., Walter, U., Smolenski, A. (2003). Endothelium-dependent and -independent relaxation and VASP serines 157/239 phosphorylation by cyclic nucleotide-elevating vasodilators in rat aorta. *Biochemical Pharmacology*, 65(3), 397–405.
47. Silbernegl S, Lang F. Atlas patofyziologie člověka. Praha: Grada, 2001, 390 s, ISBN 80-7169-968-3.
48. Stennett, A. K., Qiao, X., Falone, A. E., Koledova, V. V., & Khalil, R. A. (2009). Increased vascular angiotensin type 2 receptor expression and NOS-mediated mechanisms of vascular relaxation in pregnant rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(3), H745–H755.
49. Thomas, G., Chung, M., & Cohen, C. J. (1985). A dihydropyridine (Bay k 8644) that enhances calcium currents in guinea pig and calf myocardial cells. A new type of positive inotropic agent. *Circulation Research*, 56(1), 87–96.
50. Tomko J, Kresánek J, Hubík J, Suchý V, Felklová M, Sikyta B, Libický A. Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty. Martin: Osveta,1999. 422 s. ISBN: 8080630143.
51. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405(6787), 647–655.
52. Trojan S, a kol. Lékařská fyziologie. 4. vyd. Praha: Grada, 2003:772. ISBN 80-247-0512-5.

53. VEIZEROVÁ, L., SVĚTLÍK, J., KETTMANN, V (2007). Napětovo riadené vápnikové kanály: štruktúra, charakteristika a terminológia. Čes. slov. Farm., 56, 178–182.
54. Vetri F, Saha Roy Choudhury M, Pelligrino DA, Sundivakkam P. (2014). BKCa channels as physiological regulators: a focused review. Journal of Receptor, Ligand and Channel Research, 7, 3–13.
55. Wolfgang Auch-Schwelk, Claus Bossaller, Matthias Claus, Kristof Graf, Michael Grafe, Eckart Fleck. (1993). ACE inhibitors are endothelium dependent vasodilators of coronary arteries during submaximal stimulation with bradykinin. Cardiovascular Research; 27:312-317.
56. Zhou, Y., Varadharaj, S., Zhao, X., Parinandi, N., Flavahan, N. A., & Zweier, J. L. (2005). Acetylcholine causes endothelium-dependent contraction of mouse arteries. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 289(3), H1027–H1032.