

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Studium mechanismu vasodilatačního účinku 3,4-dihydroxyfenyloctové
kyseliny a 4-methylkatecholu *ex vivo***

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Veronika Hodinová

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

V Hradci Králové, 2020

.....

Touto cestou bych chtěla moc poděkovat vedoucí své práce paní PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za ochotu, rady, vstřícnost a strávený čas nad konzultacemi ohledně práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za veškerou psychickou podporu, především prarodičům, mamince a sestře, bez nichž by tato práce nikdy nevznikla.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Mgr. Veronika Hodinová

Školitel: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Studium mechanismu vasodilatačního účinku 3,4-dihydroxyfenyloctové kyseliny a 4-methylkatecholu *ex vivo*

Cílem této práce bylo ověřit, metodou izolované aorty potkana *ex vivo*, několik mechanismů vasodilatačního účinku dvou kolonických metabolitů flavonoidů, kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové a 4-methylkatecholu. Potvrdili jsme, že oba testované metabolity vykazují vasorelaxační účinky. Mechanismy vasodilatačního účinku jsme zjišťovali pomocí experimentů s inhibítorem cyklooxygenázy a dále prací s inhibitory draslíkových kanálů aktivovaných vápníkem. Zjistili jsme, že na vasodilatačním působení kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové se pravděpodobně podílejí jak cyklooxygenáza, tak některé podtypy draslíkových kanálů aktivovaných vápníkem. Mechanismus vasodilatačního účinku 4-methylkatecholu se nepodařilo zjistit, výsledky byly nejednoznačné. Účast cyklooxygenázy je však nepravděpodobná.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Mgr. Veronika Hodinová

Supervisor: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Title of rigorous thesis: The *ex vivo* study of mechanism of vasodilatation effect of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol

The aim of this thesis was to prove some mechanisms of vasorelaxation effects caused by two colonic metabolites of flavonoids, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, by the *ex vivo* method of isolated rat's aorta. We confirmed the vasorelaxation effects in both of the metabolites. We found out the mechanisms of vasorelaxation effect by experiments with the inhibitor of cyclooxygenase and also by experiments with inhibitors of calcium-activated potassium channels. We found out that the cyclooxygenase as well as some subtypes of calcium-activated potassium channels have both participated in the vasodilatation effect of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. We were not able to confirm the mechanism of vasodilatation effect of 4-methylcatechol, the results were ambiguous. The participation of the inhibition of cyclooxygenase is unlikely.

OBSAH

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	8
2	ÚVOD.....	10
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	11
3.1	<i>Cévy</i>	<i>11</i>
3.1.1	Stavba cévní stěny tepny.....	11
3.1.2	Stavba cévní stěny žíly	12
3.1.3	Typy cév	12
3.1.3.1	Pružník	12
3.1.3.2	Rezistenční cévy	13
3.1.3.3	Prekapilární sfinktery	13
3.1.3.4	Kapiláry.....	13
3.1.3.5	Arteriovenózní zkraty	14
3.1.3.6	Kapacitní cévy.....	14
3.1.4	Anatomie aorty	14
3.1.4.1	Vzestupná aorta.....	15
3.1.4.2	Oblouk aorty	15
3.1.4.3	Hrudní aorta	16
3.1.4.4	Břišní aorta	17
3.1.4.5	Středová křížová tepna.....	18
3.2	<i>KONTRAKCE HLADKÉHO SVALU</i>	<i>19</i>
3.2.1	Mechanismus kontrakce	19
3.2.2	Mechanismus relaxace	20
3.2.3	Řídící mechanismy krevního oběhu	20
3.2.3.1	Myogenní regulační mechanismy	21
3.2.3.2	Endotelová regulace	21
3.2.3.3	Metabolická regulace	21
3.2.3.4	Nervové regulační mechanismy	22
3.2.3.5	Hormonální regulační mechanismy	23
3.2.4	Vasodilatancia.....	24

3.3	<i>UCL-1684</i>	25
3.4	<i>TRAM-34</i>	26
3.5	<i>INDOMETHACIN</i>	28
3.6	<i>FLAVONOIDY</i>	29
3.6.1	Metabolismus flavonoidů	32
3.6.2	Metabolismus kvercetinu	33
3.6.3	Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová.....	33
3.6.4	4-Methylcatechol	35
4	CÍL PRÁCE	37
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
5.1	<i>Materiál</i>	38
5.1.1	Pomůcky a přístroje	38
5.1.2	Chemikálie	39
5.1.3	Testované látky	40
5.1.4	Testovaná zvířata	40
5.2	<i>Metodika</i>	40
5.2.1	Příprava Krebs-Henseleitova živného roztoku	40
5.2.2	Průběh experimentu	41
6	VÝSLEDKY	44
7	DISKUSE	51
8	ZÁVĚR	55
9	LITERATURA	56

1 SEZNAM ZKRATEK

ACE = angiotenzinogen konvertující enzym

ADP = adenosindifosfát

ANP = atriální natriuretický peptid

ATP = adenosintrifosfát

BDNF = mozkový neurotrofický faktor

Ca²⁺ = vápenaté kationty

cAMP = cyklický adenosinmonofosfát

cGMP = cyklický guanosinmonofosfát

CO = oxid uhelnatý

CO₂ = oxid uhličitý

COX = cyklooxygenáza

CYP = cytochrom P450

DAG = diacylglycerol

3,4-DHPA = kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová

EDHF = hyperpolarizující faktor odvozený z endotelia

EDRF = endoteliální relaxační faktor

3-HPPA = kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová

IK_{Ca} = vápenatými kationty aktivované draslíkové kanály, středně vodivé

IP₃ = inositoltrifosfát

KVO = kardiovaskulární onemocnění

LPC = lysofosfatidylcholin

4-MC = 4-methylcatechol

NGF = nervový růstový faktor

NO = oxid dusnatý

NOS = syntáza oxidu dusnatého

O₂ = kyslík

PDGF = destičkový růstový faktor

SK_{Ca} = vápenatými kationty aktivované draslíkové kanály s nízkou vodivostí

VEGF = vaskulární endoteliální růstový faktor

2 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) představují nejčastější příčinu úmrtí na celém světě. Mezi kardiovaskulární onemocnění řadíme arteriální hypertenzi, hyperlipidémii, aterosklerózu, tromboembolickou nemoc, ischemickou chorobu dolních končetin, ischemickou chorobu srdeční, srdeční arytmie a srdeční selhávání. Pokud je kardiovaskulární onemocnění diagnostikováno v počátku a nejedná se o život ohrožující stav, je možné jej zvrátit nefarmakologickou léčbou. Taková léčba však mnohdy nestačí a je potřeba připojit léčbu farmakologickou. Existuje množství léčiv, která zlepšují kvalitu života lidí s onemocněním kardiovaskulární soustavy. Je však nutné vyvíjet stále nová léčiva, přičemž vhodným zdrojem mohou být přírodní látky. Jako příklad lze uvést flavonoidy, kdy existuje již celá řada studií zabývajících se pozitivním vlivem těchto látek na živý organismus. Je však důležité zohlednit metabolizaci flavonoidů v organismu a uvědomit si, že nositelem určitého pozitivního účinku není flavonoid samotný, nýbrž jeho metabolit. (Lopez a Jan 2019, Vlček et al. 2010, WHO 2017)

Rigorózní práce se zabývá vlivem metabolitů kvercetinu, 4-methylkatecholu a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové, na aortu potkana *ex vivo*. Ukazuje se, že obě sloučeniny mají vasorelaxační účinek. Mohly by se proto podílet na kardioprotektivním působení kvercetinu a do budoucna být potenciálně využitelné např. v rámci hledání nových možností léčby vysokého krevního tlaku. Práce zkoumá dva možné mechanismy vasorelaxačního účinku obou látek.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Cévy

Oběhový systém je tvořený různými typy cév. Zjednodušeně lze cévy rozdělit na tepny a tepénky, které vedou krev ze srdce do tkání; tenkostěnné kapiláry, umožňující výměnu plynů a metabolitů; žíly a žilky, kterými se krev navrácí z těla zpět do srdce. Podle funkce můžeme však cévy rozdělit do šesti kategorií, které budou zmíněny dále. (Trojan et al. 1994, Ward et al. 2005)

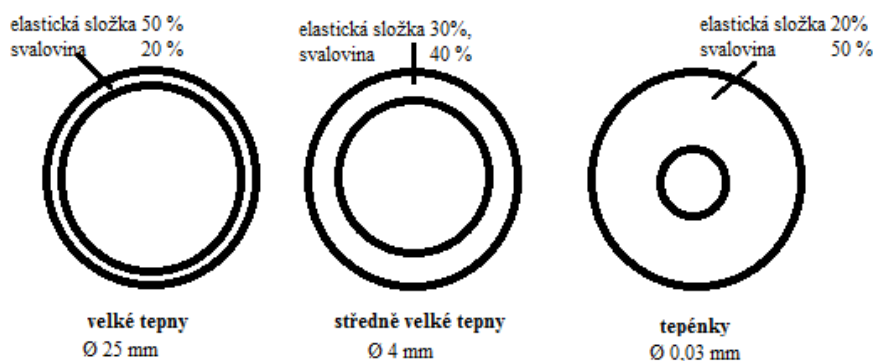
Stavba cévní stěny je značně přizpůsobena funkci cévy, cévní stěna se liší zastoupením jednotlivých složek. Obecně lze stěnu cévy popsat třemi základními vrstvami. (Trojan et al. 1994)

3.1.1 Stavba cévní stěny tepny

Vnitřní vrstva cévní stěny tepny je *tunica intima*. Tvoří ji endotelové buňky, pod nimiž se nachází seskupení elastických, kolagenních vláken a elastických blanek. Endotel má mnoho funkcí. Vytváří nesmáčivý povrch mezi krví a cévou, tvoří vasodilatační (oxid dusnatý, prostacyklin) a vasokonstrikční (např. endotelin-I, tromboxan A₂) působky, ovlivňující průsvit cévy. Důležitou vlastností endotelu je i antitrombotické působení. (Čihák 1997, Trojan et al. 1994, Ward et al. 2005)

Nejsilnější vrstvou tepenné stěny je *tunica media* – střední vrstva. Skládá se z buněk hladké svaloviny opřádaných elastickými a kolagenními vlákny. Velké tepny jsou elastického typu, převládá u nich elastická složka. Středně velké tepny mají elastickou a svalovou složku v rovnováze, u malých tepen převažuje svalovina (obrázek 1). (Čihák 1997, Kopecký a Cichá 2005)

Povrch tepny tvoří *tunica externa*, která se skládá z vazivové vrstvy s elastickými a kolagenními vlákny. Vlákna přecházejí do vaziva v bezprostřední blízkosti tepny, čímž cévu fixují v jejím okolí. (Čihák 1997, Trojan et al. 1994)



Obr. 1 Schéma průsvitu velkých, středních a malých tepen

Modifikováno z: Trojan et al. (1994)

3.1.2 Stavba cévní stěny žíly

Žilní stěny mají také tři vrstvy jako tepny. Jsou zde určité odlišnosti, vrstvy cévní stěny mají menší tloušťku a rozdíl je také v poměru zastoupení jednotlivých složek cévní stěny. Ve vnitřní vrstvě se elastická vlákna a elastické blanky vyskytují až u středně velkých a velkých žil. *Tunica media* je tenčí a obsahuje méně hladké svaloviny, než je tomu u tepen. Na některých žilách svalovina dokonce chybí. Pro žíly jsou charakteristické chlopně. Jedná se o vazivem vyztužené výběžky vnitřní stěny cévy, které jsou kryté endotelem. Žilní chlopně umožňují průtok krve pouze jedním směrem – k srdci. (Čihák 1997)

3.1.3 Typy cév

3.1.3.1 Pružník

Velké a středně velké tepny můžeme označit slovem pružník. Krev protéká tepnami rychle, proto tyto cévy představují rychlý transport krve do periferie. Jsou velice elastické, *tunica media* se skládá především z elastických vláken a pouze malého množství buněk hladké svaloviny. Vysoká elasticita stěn je patrná a velice důležitá zejména v aortě, kam při systole proudí krev ze srdce pod tlakem, který známe pod pojmem systolický krevní tlak. Stěna aorty se vlivem tohoto tlaku značně roztáhne. Při diastole se stěny cévy navrací do původního stavu a udávají krevi tlak, který označujeme pojmem diastolický. (Čihák 1997, Mourek 2005, Trojan et al. 1994)

3.1.3.2 Rezistenční cévy

Dalším typem jsou rezistenční cévy, mezi něž patří tepénky, jsou to nejtenčí arterie. Mají relativně silnou stěnu a malý průsvit. Obsahují značný podíl hladké svaloviny, díky čemuž rychle dokážou měnit svůj průsvit, a tím regulovat periferní odpor. Pokud dojde k vasokonstrikci, tedy pokud je menší průsvit, periferní odpor je větší a narůstá hodnota krevního tlaku. Tepénky regulují přítok krve do jednotlivých tkání. (Čihák 1997, Mourek 2005, Trojan et al. 1994)

3.1.3.3 Prekapilární sfinktery

Pojmem prekapilární sfinktery označujeme konečné úseky tepének. Množství hladké svaloviny jim umožňuje vasokonstrikci či vasodilataci, čímž ovlivňují průtok krve kapilární sítí. Jejich význam tkví také v tvorbě tkáňového moku. Hodnota krevního tlaku přesahuje na arteriálním konci vlásečnic hodnotu onkotického tlaku, následkem je filtrace části krevní plazmy do tkání. Za den je tak přefiltrováno až dvacet litrů tekutiny, většina je však vstřebána zpět na venózním konci kapilár, kde je naopak hodnota onkotického tlaku vyšší než krevní tlak. (Mourek 2005, Rokyta et al. 2016)

3.1.3.4 Kapiláry

Kapiláry neboli vlásečnice jsou velice úzké cévy o průměru kolem 7 μm . Šířka kapilár je různá, nejtenčí kapiláry najdeme v oční sítnici či ve svalech (5 – 7 μm), široké kapiláry (12 – 15 μm) se nacházejí např. v játrech či kostní dřeni a nazývají se sinusoidy. Vlasečnice tvoří velmi hustou síť, jež představuje prostředí pro vlastní výměnu plynů, živin a odpadních látek mezi krví a tkáněmi. Stěna vlásečnic je velmi tenká, skládá se z jedné vrstvy endotelových buněk, mezi nimiž jsou často mezery - póry. Krev proudí vlásečnicemi pomalu, pro průtok krve je důležitý tlakový spád. Vlasečnice postrádají schopnost kontrakce, jejich průsvit se mění v závislosti na práci rezistenčních cév a prekapilárních sfinkterů. Průsvit kapilár se mění i vlivem některých působků, histamin způsobuje rozšíření kapilár, adrenalin je naopak zodpovědný za jejich zúžení. (Čihák 1997, Rokyta et al. 2016, Trojan et al. 1994)

3.1.3.5 Arteriovenózní zkraty

Arteriovenózní zkraty (anastomózy) představují anatomicko-funkční systém, který obchází kapilární síť. V těchto místech tepénky nepřecházejí do kapilár, ale mají přímé spojení do žil, dochází tak k rychlému přesunu krve z tepenného systému do žilního. Pokud jsou tyto cévy otevřeny, průtok krve kapilárami se v příslušných tkáních snižuje, případně zcela zastavuje. Na některých místech jsou zkraty jednoduché, jinde mají podobu klubíček. Vyskytují se pouze v některých tkáních. Časté jsou v kůži bříšek prstů a dlaně, dále se nachází např. v plicích, ledvinách či ve štítné žláze. Největší arteriovenózní zkrat je *glomus coccygeum*, nacházející se na slabé křížové tepně před hrotem kostrče. (Čihák 1997, Mourek 2005, Trojan et al. 1994)

3.1.3.6 Kapacitní cévy

Mezi kapacitní cévy řadíme především žíly. Mají schopnost se značně roztáhnout, mohou tak pojmout velké množství krve a plní funkci rezervoáru. Tento sběrný systém je velice důležitý vzhledem ke stále se měnícímu transportu krve v jednotlivých orgánech, v případě potřeby je krev rychle dodána do oběhu. Žíly zabezpečují návrat krve zpět do srdce. (Čihák 1997, Trojan et al. 1994)

3.1.4 Anatomie aorty

Aorta je nepárová céva, je nejmohutnější tepnou celého těla. Rozvodem krve po celém organismu zajišťuje okysličení všech orgánů. Aorta vystupuje z levé srdeční komory kraniálně jako vzestupná aorta (*aorta ascendens*). Pokračuje jako asi 6 cm dlouhý oblouk aorty (*arcus aortae*). Od levého boku třetího hrudního obratle následuje sestupná aorta (*aorta descendens*), kterou bránice rozděluje na hrudní aortu (*aorta thoracica*) a břišní aortu (*aorta abdominalis*). Hrudní aorta sestupuje po levém boku hrudních obratlů a postupně se dostává před ně. Břišní aorta sestupuje až před čtvrtý hrudní obratel, kde se rozděluje na dvě kyčelní tepny – *arteriae iliacae communes*. Místo větvení nazýváme bifurkací aorty (*bifurcatio aortae*). Vlastním pokračováním aorty je tenká aorta (*arteria sacralis mediana*), která sestupuje z bifurkace, případně z levé kyčelní tepny, až na kostrč. (Čihák 1997, Čížek 2012, Sabol et al. 2015)

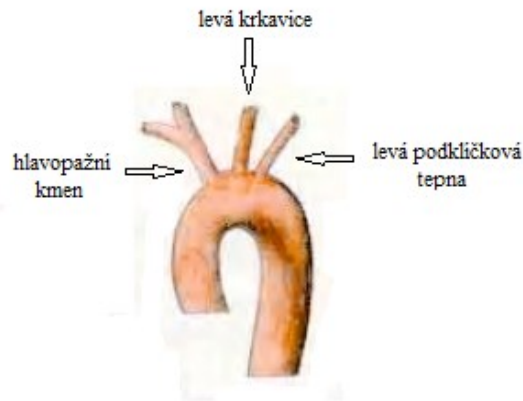
3.1.4.1 Vzestupná aorta

Vzestupná aorta (*aorta ascendens*) má délku kolem pěti centimetrů, šířka činí 2,2 – 3 cm. Aorta začíná uvnitř perikardu a vede paralelně po pravé straně plicní tepny, spolu s ní je kryta perikardiálním vakem. Nad aortální chlopní se vyskytují tři výklenky (sinusy), rozšířené místo výklenků se nazývá aortální bulbus. Ascendentní aorta má pouze dvě větve, a to pravou a levou koronární tepnu. Pravá koronární tepna vystupuje z pravého výklenku, levá koronární tepna vystupuje z levého výklenku. Koronární tepny se starají o zásobení myokardu krví. Konec vzestupné aorty bývá rozšířený, je to pravděpodobně způsobené nárazy krve proudící ze srdce. (Čihák 1997, Sabol et al. 2015)

3.1.4.2 Oblouk aorty

Aortální oblouk (*arcus aortae*) navazuje na vzestupnou aortu v úrovni druhé žeberní chrupavky. Směřuje vzhůru a nalevo před průdušnicí, pokračuje přes levou průdušku, za průduškou překřičuje levou část jícnu a přikládá se k levé straně těla třetího hrudního obratle. Od třetího hrudního obratle následuje sestupná aorta. Ke spodní části vrcholu oblouku aorty se připojuje *ligamentum arteriosum*, což je vazivová spojka mezi obloukem aorty a plicní tepnou. (Čihák 1997, Sabol et al. 2015)

Z aortálního oblouku vystupují tři hlavní větve, které distribuují krev do horních končetin, krku, hlavy a mozku. První odstupující větví je hlavopažní kmen (*truncus brachiocephalicus*), jedná se o společný kmen pravé krkavice a pravé podklíčkové tepny. Další odstupující větví aortálního oblouku je levá krkavice, poslední odstupuje levá podklíčková tepna. Podklíčkové tepny transportují krev do horních končetin, krkavice se starají o distribuci krve do krku, hlavy a mozku. Pokud tyto tři hlavní větve odstupují v popsaném pořadí, jedná se o fyziologický stav, který se vyskytuje asi u 70 % populace (obrázek 2). Mohou však existovat i různé variace, kdy větve aortálního oblouku odstupují v jiném pořadí, případně mají všechny tři větve jeden společný kmen. Některé variace nemusí způsobovat zdravotní problémy a dotýčný se o nich zpravidla dozvídá až při náhodném vyšetření. Jiné abnormality způsobují potíže, které pacienta přivádí k lékaři. (Čertík et al. 2005, Čihák 1997, Sabol et al. 2015)



Obr. 2 Fyziologické větvení oblouku aorty

Modifikováno z: Čihák (1997)

3.1.4.3 Hrudní aorta

Sestupná (descendentní) aorta navazuje na aortální oblouk ve výšce třetího hrudního obratle a pokračuje až po bifurkaci. Při průchodu bránicí, v místě zvaném *hiatus aorticus*, se sestupná aorta rozděluje na dvě části. Hrudní část aorty nazýváme hrudní aortou a břišní dutinou probíhá břišní aorta. (Čihák 1997)

Hrudní aorta (*aorta thoracica*) leží v zadním mediastinu, sahá od třetího hrudního obratle po dvanáctý hrudní obratel. Začátek hrudní aorty běží podél levé strany páteře, ale postupně se aorta dostává před páteř. Větve hrudní aorty se rozdělují na viscerální, zásobující orgány, a parietální – distribuují krev do stěn hrudníku, břicha a bránice. (Čihák 1997, Sabol et al. 2015)

Viscerální větve odstupují z hrudní aorty nepárově, řadíme sem větve bronchiální, jícnovou, perikardiální a mediastinální. Bronchiální větev je tvořena dvěma až třemi tepnami, které vystupují nad sebou, zásobují průdušky, část trachey a větví se do plic, kde tvoří tzv. nutritivní oběh plic. Jícnová větev je tvořena menšími tepnami směřujícími k jícnu. Perikardiální větev je seskupení malých cév, které přivádějí krev do zadní části perikardu. Mediastinální větev zásobuje krví mízní uzliny a vazivo v mediastinu. (Čihák 1997, Sabol et al. 2015)

Parietální větve vystupují z hrudní aorty párově. Horní brániční tepna (*arteria phrenica superior*) je malá párová tepna odstupující z aorty těsně nad *hiatus aorticus*. Tuto tepnu můžeme vidět zejména u novorozenců. U dospělého člověka bývá často zakrnělá nebo přeměněná ve vazivo. Dále z hrudní aorty vystupuje devět párů

mezižebních tepen (*arteriae intercostales*) zásobujících třetí až jedenácté mezižebří. Mezižební tepny dolního úseku hrudní aorty vyživují prostřednictvím svých větví míchu. Pod dvanáctým žebrem probíhá podžeberní tepna (*arteria subcostalis*). (Čihák 1997, Sabol et al. 2015)

3.1.4.4 Břišní aorta

Břišní aorta je uložena retroperitoneálně. Začíná v *hiatus aorticus* bránice a sestupuje až před čtvrtý bederní obratel, kde dochází k vidlicovitému rozdělení aorty na dvě kyčelní tepny. Na pravé straně od aorty probíhá dolní dutá žíla, na obou stranách podél aorty jsou uloženy mízní uzliny a ganglia autonomních nervových vláken. Břišní aorta distribuuje krev do bránice, břišní stěny, bederní páteře, míchy a míšních obalů, nadledvin, ledvin, nadvarlat, varlat či ovarií a všech nepárových orgánů břišní dutiny. Větve břišní aorty můžeme rozdělit na párové větve parietální, viscerální a nepárové viscerální větve. (Čihák 1997, Sabol et al. 2015)

Mezi párové parietální větve břišní aorty patří dolní brániční tepna (*arteria phrenica inferior*), která začíná těsně pod bránicí. Větve dolní brániční tepny zásobují krví nadledviny. Dále z břišní aorty vystupují čtyři páry bederních tepen, které probíhají za velkým bederním svalem, vyživují tedy zadní svalstvo a také páteřní kanál. (Čihák 1997, Šrámek et al. 2015)

Párové viscerální větve odstupují směrem do stran a tvoří je střední nadledvinná tepna (*arteria suprarenalis media*), ledvinná tepna (*arteria renalis*), tepna varlete (*arteria testicularis*), respektive tepna vaječníku (*arteria ovarica*). Renální tepny odstupují od břišní aorty ve výši ploténky mezi prvním a druhým bederním obratlem. U přibližně třetiny populace můžeme najít zdvojenou renální tepnu, výjimečně může být tepna i ztrojená. (Čihák 1997, Cholt 2013)

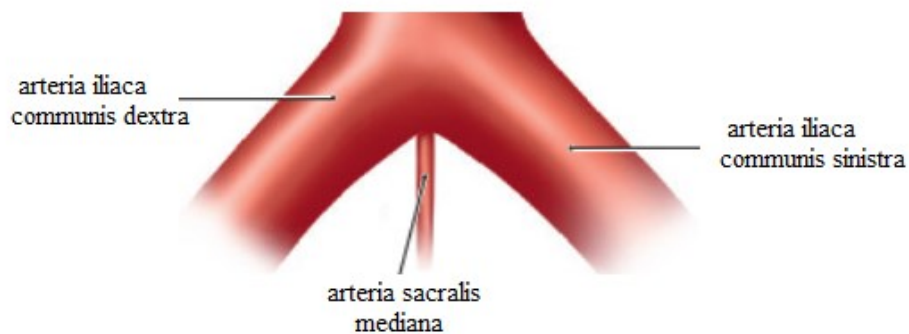
Viscerální nepárové větve břišní aorty odstupují směrem dopředu. Těsně pod bránicí odstupuje tlustý tepenný kmen (*truncus coeliacus*), je dlouhý 1 – 2 cm. Rozděluje se na tři větve – levou žaludeční tepnu (*arteria gastrica sinistra*), slezinnou tepnu (*arteria lienalis*) a jaterní tepnu (*arteria hepatica communis*). Větve kmenu rozvádí krev do jícnu, žaludku, jater, slinivky a sleziny. Asi dva centimetry pod tepenným kmenem kaudálně odstupuje horní mesenterická tepna (*arteria mesenterica superior*). Tato céva zásobuje krví slinivku, celé tenké střevo a část

tlustého střeva. V úrovni třetího bederního obratle odstupuje z břišní aorty spodní mesenterická tepna (*arteria mesenterica inferior*), směřuje také kaudálně a cévně zásobuje tlusté střevo až po rektum. (Čihák 1997, Saveljev 2014)

Břišní aorta končí bifurkací (obrázek 3) ve výši čtvrtého bederního obratle. Aorta se zde vidlicovitě rozděluje na levou kyčelní tepnu (*arteria iliaca communis sinistra*) a pravou kyčelní tepnu (*arteria iliaca communis dextra*). (Čihák 1997, Kopecký a Cichá 2005)

3.1.4.5 Středová křížová tepna

Vlastním pokračováním sestupné aorty je středová křížová tepna (*arteria sacralis mediana*). Jedná se o tenkou tepnu, která vystupuje z místa bifurkace. Její zakončení najdeme před hrotem kostrče v klubičku arteriovenózních zkratů zvaném *glomus coccygeum*. (Čihák 1997)



Obr. 3 Bifurkace aorty

Modifikováno z: Anonym (2017)

3.2 KONTRAKCE HLADKÉHO SVALU

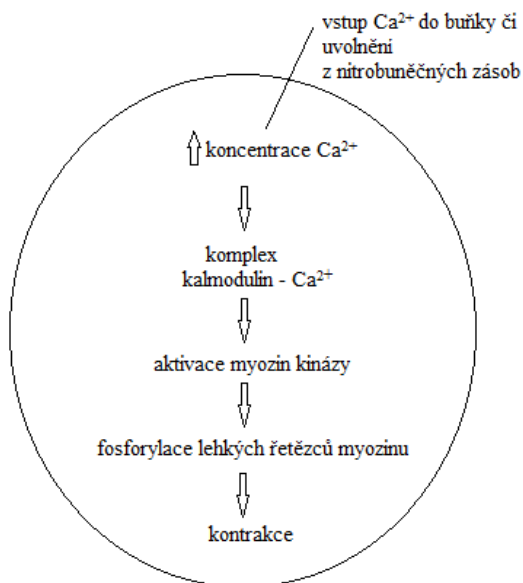
Buňky hladkého svalu obsahují, stejně jako kosterní svalstvo, kontraktilní vlákna - aktin a myozin. Od kosterního svalu se však zdejší isoformy aktinu a myozinu liší svým uspořádáním a vlastnostmi. Množství aktinu je přibližně dvakrát vyšší než u kosterní svaloviny, myozinu je naopak třikrát méně. Vlákna aktinu vystupují z tzv. denzních tělísek, denzní tělíska sousedních buněk mohou být vzájemně spojena, čímž je pak zajištěn přenos kontrakce. Vlákna myozinu jsou umístěna mezi vlákny aktinu. (Kittnar 2011, Lüllmann et al. 2004, Trojan et al. 1994)

Funkci troponinu C, na něž se v příčně pruhovaném svalu vážou vápenaté ionty, nahrazuje v hladkém svaly kalmodulin. Kalmodulin je protein obsahující čtyři vazebná místa pro navázání vápenatých kationtů. (Lüllmann et al. 2004, Trojan et al. 1994)

3.2.1 Mechanismus kontrakce

Ke kontrakci hladké svaloviny je potřeba zvýšená koncentrace vápenatých kationtů (Ca^{2+}) v cytosolu. Koncentrace Ca^{2+} v cytosolu roste díky vstupu Ca^{2+} do buňky z extracelulárního prostředí, případně uvolněním zásob Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula. Vstup Ca^{2+} do buněk je nejčastěji zprostředkován působením nějaké vasokonstriční látky. Látka se váže na receptor, vazba způsobí aktivaci fosfolipázy C, která vytváří z membránových fosfolipidů druhé posly – inositoltrifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). IP_3 se spojí s receptory přítomnými v sarkoplazmatickém retikulu, což vede k otevření vápníkových kanálů a vápenaté kationty vstupují do cytoplazmy. DAG je zodpovědný za vstup Ca^{2+} do buněk tím, že aktivuje receptory řízené kanály. Další možností vstupu vápenatých kationtů do buněk je cestou depolarizace buněčné membrány vasokonstriční látkou, která má za následek otevření napětově řízených Ca^{2+} kanálů. (Trojan et al. 1994, Ward et al. 2005)

Vápenaté kationty se spojují s kalmodulinem a tento komplex pak působí na kinázu myozinu. Kináza katalyzuje za využití cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) reakci, při níž dochází k přenosu fosfátových skupin na řetězce myozinu. Fosforylace umožní reakci myozinu s aktinem a výsledkem je kontrakce hladkého svalu (obrázek 4). (Lüllmann et al. 2004, Trojan et al. 1994)



Obr. 4 Schématické znázornění procesu kontrakce hladkého svalu

Modifikováno z: Lüllmann et al. (2004)

3.2.2 Mechanismus relaxace

Relaxace hladkého svalu je zahájena poklesem koncentrace Ca^{2+} v cytosolu. Dochází k uvolnění Ca^{2+} z vazby na kalmodulin. Vápenaté kationty jsou buďto pumpovány zpět do zásobních míst v buňce pomocí Ca^{2+} ATPázy hladkého endoplazmatického retikula, nebo se vápenaté kationty transportují skrz buněčnou membránu mimo buňku. V procesu relaxace se uplatňuje cytoplazmatická fosfatáza, jejímž úkolem je odštěpit fosfátovou skupinu z řetězce myozinu. Odštěpení fosfátové skupiny vede k ukončení interakce aktinu s myozinem a dochází k relaxaci hladkého svalu. (Kittnar 2011, Lüllmann et al. 2004, Trojan et al. 1994, Ward et al. 2005)

3.2.3 Řídící mechanismy krevního oběhu

Jednotlivé orgány v těle mají rozdílné požadavky na krevní zásobení a dodávku kyslíku. Zároveň musí krevní oběh fungovat jako celek. Z tohoto důvodu se vytvořily různé regulační mechanismy. Některé se specializují na místní požadavky průtoku krve, mluvíme o místním řízení cirkulace krve. Jiné mechanismy se zaměřují na funkci krevního oběhu jako celku. Jedná se proto o celkové regulační mechanismy, do této skupiny spadá nervová a hormonální regulace. (Trojan et al. 1994)

Místní regulační mechanismy zajišťují průtok takového množství krve tkáněmi, které odpovídá metabolické aktivitě jednotlivých tkání. V případě změny krevního tlaku je úkolem místních regulačních mechanismů zajistit konstantní průtok krve, zároveň by nemělo docházet ani k výrazným změnám rychlosti proudění krve. (Trojan et al. 1994)

3.2.3.1 Myogenní regulační mechanismy

Zvýšení tlaku krve má za následek roztažení cévní svaloviny. Hladká svalovina cévy na tento jev zareaguje zmenšením průsvitu, tedy kontrakcí cévy. Na základě tohoto obranného mechanismu se průtok krve příslušnou cévou nezmění. Myogenní regulační mechanismus můžeme pozorovat zejména v ledvinách, kde je důležité, aby glomerulární filtrace byla nezávislá na změnách krevního tlaku a zůstala tak konstantní. Podobně se myogenní regulace uplatňuje v mozku. Ve vzpřímené poloze se vlivem gravitace snižuje tlak v cévách mozku. Hladká svalovina mozkových cév dilatuje, čímž zůstává zachován konstantní průtok krve tímto orgánem. (Trojan et al. 1994)

3.2.3.2 Endotelová regulace

Cévní endotel obsahuje neaktivní formu syntázy oxidu dusnatého (NOS). Při nárůstu koncentrace vápenatých kationtů v endotelu dochází k vazbě vápenatých kationtů na kalmodulin, nastává proces vasokonstrikce, který je popsán výše. Cévní endotel musí na daný jev zareagovat obranným mechanismem, aktivuje enzym NOS. Enzym pak z esenciální aminokyseliny L-argininu syntetizuje oxid dusnatý (NO), endoteliální relaxační faktor (EDRF), velice důležitou látku pro zajištění konstantního krevního průtoku a tlaku. Mechanismus dilatace se vysvětluje vazbou NO s guanylátcyklázou v hladkých svalových buňkách. Dochází ke zvýšení koncentrace cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), který aktivuje proteinkinázu G. Proteinkináza G inhibuje myozin kinázu, snižuje se tvorba aktino-myozinových můstků a svalovina cévy dilatuje. Relaxace cévy prostřednictvím EDRF je mohutnější v tepnách než v žilách. (Rokyta et al. 2016, Švihovec et al. 2018, Trojan et al. 1994)

3.2.3.3 Metabolická regulace

V každé tkáni je krevní průtok regulovaný na základě aktuální potřeby dodávky kyslíku a živin, případně na základě potřeby odvést zplodiny metabolismu. Při zvýšení

metabolických procesů určitého orgánu se zvýší spotřeba kyslíku, dochází ke snížení parciálního tlaku kyslíku a naopak ke zvýšení koncentrace oxidu uhličitého a dalších zplodin metabolismu. Kyslík či vznikající metabolity působí na hladký sval cévy buďto přímo, nebo prostřednictvím endoteliálních receptorů, což má za následek výše zmíněnou produkci NO a relaxaci cévy. Zajistí se tak zvýšený průtok krve danou oblastí. (Trojan et al. 1994)

K metabolickým regulacím lze zařadit i enzymatickou regulaci, kterou můžeme pozorovat zejména v některých žlázách. Buňky žláz trávicího traktu produkují enzym kallikrein. Enzym spustí řetězec reakcí, na jehož konci je vysoce účinný vasodilatátor - bradykinin. Díky tomuto mechanismu dochází při aktivaci trávicího traktu ke zvýšenému prokrvení. (Trojan et al. 1994)

3.2.3.4 Nervové regulační mechanismy

Nervové regulační mechanismy mají za úkol především udržení stálého tlaku krve. Řadíme sem činnost vegetativního nervového systému - především sympatiku. Jeho hlavním mediátorem je noradrenalin, který vykazuje vasokonstrikční působení, vyvolává kontrakci hladké svaloviny cév. Klidová vzruchová frekvence, kterou sympatikus přivádí do arteriol, zajišťuje klidový tonus cévy. Při zvýšení frekvence dochází ke kontrakci cévy, při snížení frekvence céva naopak dilatuje. Velké množství přítomných receptorů provádí neustálou kontrolu proudění krve a podává o aktuálním stavu informaci do vasomotorických center v prodloužené míše. Tato centra pak řídí činnost srdce a hladkých svalů cév. Nejznámějšími receptory jsou baroreceptory, nejvíce se jich nachází v oblouku aorty a karotickém sinu, kde monitorují napětí příslušných cév a hlídají tak krevní tlak. Při zjištění zvýšené aktivity baroreceptorů odchází informace do vasomotorických oblastí mozkového kmene, zde dojde k utlumení činnosti sympatiku a aktivuje se činnost parasympatiku. Minutový srdeční výdej se snižuje, klesá periferní cévní odpor, výsledkem je normalizace krevního tlaku. (Langmeier et al. 2009, Trojan et al. 1994)

Důležité jsou i chemoreceptory. Periferní chemoreceptory můžeme najít v oblouku aorty a v místě rozvětvení karotid. Při poklesu parciálního tlaku O₂ a zvýšení parciálního tlaku CO₂ dochází k jejich stimulaci. Centrální chemoreceptory v prodloužené míše reagují především na parciální tlak CO₂ a změny pH. Zvýšení

parciálního tlaku CO₂ a acidóza navodí vasokonstrikci, naopak snížení parciálního tlaku CO₂ a alkalóza způsobí dilataci cév. (Trojan et al. 1994)

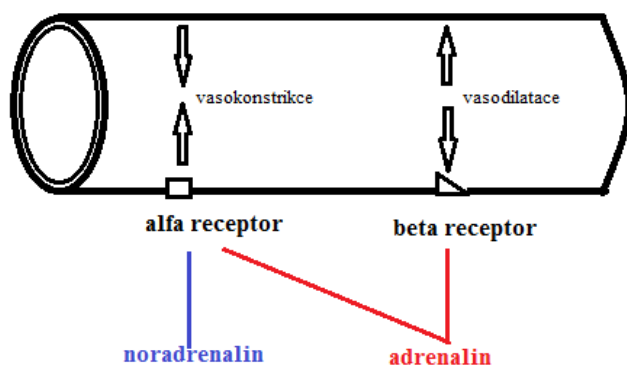
3.2.3.5 Hormonální regulační mechanismy

Katecholaminy patří jednoznačně mezi nejdůležitější hormony, které působí na hladkou svalovinu cév. Mezi katecholaminy řadíme adrenalin a noradrenalin. Katecholaminy působí na hladký sval cévy prostřednictvím receptorů, v cévách jsou přítomny především α_1 a β_2 receptory, β_1 receptory se vyskytují hlavně v srdci. Aktivace α_1 receptorů v cévách vede ke kontrakci hladké svaloviny, naopak aktivace β_2 receptorů vede k její dilataci. Přičemž noradrenalin působí pouze na alfa-receptory, jeho působení vede proto k vasokonstrikci. Adrenalin ovlivňuje alfa i beta receptory. Záleží tedy na tom, zda je v hladké svalovině cév převaha α_1 či β_2 receptorů. Podle toho pak proběhne vasokonstrikce či vasodilatace (obrázek 5). (Langmeier et al. 2009, Trojan et al. 1994)

Buňky endotelu v hladké svalovině cévy produkují látku zvanou endotelin, jež působí vasokonstrikčně. Endotelin způsobuje vzestup krevního tlaku. (Trojan et al. 1994)

Důležitou úlohu hraje i renin-angiotensinový systém. Renin je hormon produkovaný buňkami juxtaglomerulárního aparátu ledvin. Jeho úkolem je štěpit plazmatickou bílkovinu angiotenzinogen na angiotenzin I, který je však neaktivní. Angiotenzinogen konvertující enzym (ACE) přeměňuje angiotenzin I na aktivní formu – angiotenzin II. Tato aktivní forma vykazuje silné vasokonstrikční působení. (Rokyta et al. 2016, Trojan et al. 1994)

K hormonálním regulačním mechanismům musíme zařadit i atriální natriuretický peptid (ANP). Pokud dojde ke zvýšení žilního návratu, srdeční předsíň zareaguje vyloučením natriuretického peptidu. ANP snižuje tlak krve, antagonizuje vasokonstrikční působení jiných látek. (Trojan et al. 1994)



Obr. 5 Znáznornění působení adrenalinu a noradrenalinu na cévu

Modifikováno z: Trojan et al. (1994)

3.2.4 Vasodilatancia

Vasodilatancia jsou léčiva, která se používají k navození relaxace hladké svaloviny cév. Jedná se o heterogenní skupinu léčiv s různými mechanismy účinku i cílovými místy působení. (Švihovec et al. 2018)

Nejvýznamnějším mechanismem účinku je přímé ovlivnění iontových kanálů s následným poklesem Ca^{2+} v cytosolu. Tímto mechanismem účinkují blokátory vápníkových kanálů či aktivátory draslíkových kanálů. Blokátory vápníkových kanálů snižují aktivitu vápníkových kanálů typu L ve stěně cév, některé látky z této skupiny léčiv však vykazují i účinek na myokard, případně na další typy vápníkových kanálů v různých částech těla. Aktivátory draslíkového kanálu zapříčiní zvýšený přísun draslíku do sarkoplazmy, nastává hyperpolarizace buněčné membrány a následně se snižuje citlivost k aktivaci vápníkového kanálu typu L. (Švihovec et al. 2018)

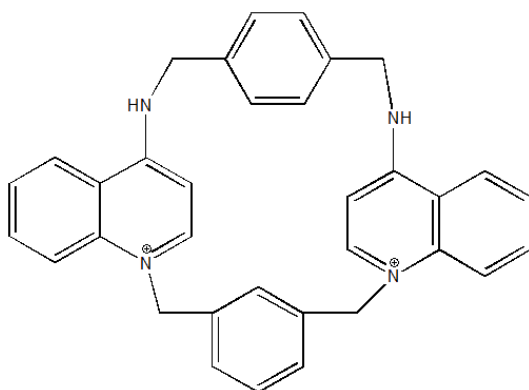
Dalším mechanismem účinku vasodilatancií je zvýšení nabídky cAMP či cGMP. Výsledku se docílí buďto stimulací tvorby těchto cyklických nukleotidů nebo inhibicí jejich degradace. Léčiva stimulující tvorbu cAMP / cGMP nejprve aktivují příslušnou cyklázu, cestou adenylátcyklázy se podněcuje syntéza cAMP, aktivací guanylátcyklázy dochází k syntéze cGMP. Léčiva inhibující degradaci cAMP / cGMP blokují fosfodiesterázu, enzym, který zmíněné nukleotidy odbourává. (Švihovec et al. 2018)

Některá vasodilatancia vykazují svůj účinek snížením aktivity vasokonstrikčních receptorů – zejména receptorů pro endotelin. (Švihovec et al. 2018)

3.3 UCL-1684

Součástí prováděných experimentů byla práce s látkou UCL-1684. Jedná se o sloučeninu typu cyklofanu s dvěma chinolinovými a dvěma benzenovými jádry (obrázek 6). Látka je silným inhibitorem nízkovodivostních draslíkových kanálů aktivovaných vápníkem (typ SK_{Ca}). Do této skupiny draslíkových kanálů patří tři subtypy, značíme je SK₁, SK₂ a SK₃. Někdy se můžeme setkat ještě s dalším subtypem - SK₄. Jedná se o kanál s podobnými vlastnostmi, je však středně vodivý a ovlivníme ho jinými substráty, odlišíme ho označením IK_{Ca} (viz dále). Pro aktivaci SK_{Ca} kanálů není důležitá hodnota membránového potenciálu, nýbrž koncentrace Ca²⁺. Kanály obsahují Ca²⁺ vázající protein kalmodulin, díky čemuž jsou citlivé k vyšší koncentraci vápenatých kationtů a dojde k jejich aktivaci. SK₁ - SK₃ kanály jsou vysoce senzitivní ke včelímu jedu apaminu, UCL-1684 je na rozdíl od apaminu nepeptidový blokátor SK_{Ca} kanálů. Aktivace SK_{Ca} či IK_{Ca} je jedna z cest, která může vést k vasodilataci. Vasodilatace touto cestou úzce souvisí s endotelovými působky EDHF (z endotelia odvozený hyperpolarizující faktor), EDRF a metabolity kyseliny arachidonové (např. prostaglandiny). Aktivace SK_{Ca} či IK_{Ca} kanálu má za následek zvýšený proud draselných kationtů, nastává hyperpolarizace a zvyšuje se koncentrace vápenatých kationtů v cytoplazmě. Děj vyvolá spuštění obranného mechanismu, dochází k vyplavení NO či metabolitů kyseliny arachidonové a nastává vasodilatace. (Dunn 1999, Ledoux et al. 2006, Štejfá et al. 2007)

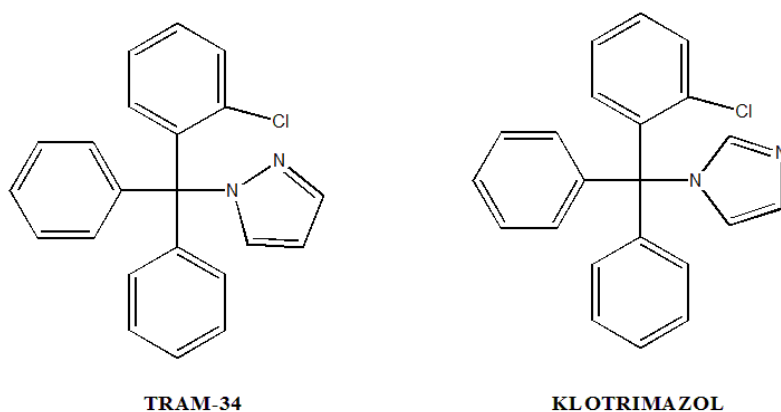
Jedna z provedených studií ukázala, že blokáda SK_{Ca} kanálů prostřednictvím UCL-1684 může hrát důležitou roli při léčbě rakoviny prsu. Užití UCL-1684 totiž způsobilo apoptózu nádorových buněk. Naopak bez blokátoru SK_{Ca} kanálů byl aktivní antiapoptotický protein, k buněčné smrti proto nedošlo a nádorové buňky dále rostly. (Abdulkareem et al. 2015)



Obr. 6 UCL-1684

3.4 TRAM-34

Další látka, s níž jsme pracovali, je TRAM-34. Jedná se o pevnou krystalickou látku, rozpustnou v organických rozpouštědlech. Systematický název látky je 1-[(2-chlorofenyl)difenylmethyl]-1H-pyrazol, chemicky je látka podobná klotrimazolu (obrázek 7). Klotrimazol vykazuje svůj antimykotický účinek inhibicí enzymu P450-Erg11P, snižuje se tak množství ergosterolu, který je důležitý pro růst fungální buňky. Ukázalo se však, že klotrimazol působí i na savčí enzymy cytochromu P450, toto působení je příčinou jeho nežádoucích účinků. Klotrimazol také blokuje vápenatými kationty aktivované draslíkové kanály (konkrétně se jedná o IK_{Ca} typ těchto kanálů). Jak je popsáno v kapitole UCL-1684, i tento kanál obsahuje kalmodulin, proto je jeho aktivace podmíněna zvýšenou koncentrací Ca^{2+} . Hodnota membránového potenciálu aktivaci IK_{Ca} kanálu neovlivňuje. IK_{Ca} kanály se nacházejí v různých buňkách po těle. Můžeme je najít v T-lymfocytech, střevním epitelu, lidských erythrocytech, v buňkách hladké svaloviny cév. Efekt klotrimazolu na zmíněné draslíkové kanály se zkoušel např. u léčby srpkovité anémie, aby se zabránilo ztrátám draslíku a vody u červených krvinek. Nežádoucí účinky klotrimazolu jsou však značné. (Dohnal et al. 2008, Ledoux et al. 2006, Wulff et al. 2000)



Obr. 7 Znárodnění sloučeniny TRAM-34 (vlevo) a klotrimazolu (vpravo)

Po objasnění účinků klotrimazolu byla snaha nalézt sloučeninu s bezpečnějším terapeutickým profilem. Představa byla, aby taková sloučenina selektivně inhibovala Ca^{2+} aktivované K^+ kanály a přitom by nevykazovala žádný účinek na lidský cytochrom P450. Bylo zjištěno, že klotrimazol je silný blokátor IK_{Ca} kanálů díky své struktuře. Imidazolové jádro a trifenylylmethylová kostra sloučeniny umožňují inhibovat IK_{Ca}

kanály. Zároveň vědci přišli na to, že klotrimazol inhibuje cytochrom P450 právě díky přítomnosti imidazolového kruhu. Díky těmto poznatkům a velkému množství pokusů se vědcům nakonec podařilo najít sloučeninu s požadovanými vlastnostmi. Zachováním trifenylmethylové kostry a náhradou imidazolového kruhu za pyrazolový kruh byla objevena sloučenina TRAM-34. Vědci následně zkusili použít kombinaci sloučeniny TRAM-34 spolu s cyklosporinem A k vyvolání imunosuprese. Zjistilo se, že potlačení aktivovaných T-lymfocytů je v této kombinaci efektivnější. Užití látky TRAM-34 se proto jeví jako vhodná možnost pro použití v kombinační terapii autoimunitních chorob. (Wulff et al. 2000)

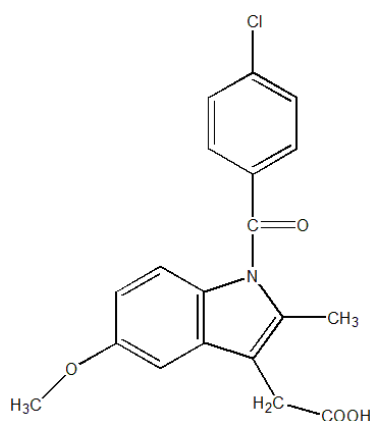
Sloučenina TRAM-34 se stala předmětem výzkumu i dalších vědců. Jedna ze studií sledovala účinek látky na mikroglie, v nichž vědci podáním lysofosfatidylcholinu (LPC) vyvolali zvýšení koncentrace intracelulárních Ca^{2+} . Při současném podání látek LPC a TRAM-34 nebyl nárůst intracelulární koncentrace vápenatých kationtů příliš výrazný. Vědci provedli pokus i s jiným inhibitorem Ca^{2+} aktivovaných K^+ kanálů, ten však LPC indukovaný nárůst Ca^{2+} neovlivnil. Studie je příkladem toho, že TRAM-34 pravděpodobně ovlivňuje buňky imunitního systému i jiným mechanismem, než jen přes popsané IK_{Ca} kanály. (Schilling a Eder 2007)

V další studii vědci pozorovali vliv sloučeniny TRAM-34 na enzymy cytochromu P450. Studie doktorky Wulff se zaměřila především na isoformu CYP3A4, v této studii se vědci zaměřili i na jiné isoformy cytochromu P450. Studie prováděli na čtyřech potkaních a pěti lidských isoformách enzymů. U potkanů TRAM-34 inhiboval tři isoformy CYP ze čtyř zkoušených. Konkrétně látka inhibovala CYP2B1, CYP2C6 a CYP2C11, na potkaní CYP1A2 látka inhibiční efekt neměla. U lidských isoform TRAM-34 silně inhiboval CYP2B6 a CYP2C19. Inhibiční efekt neměl u isoformy CYP1A2 a CYP19A1. Zajímavý vliv měl TRAM-34 na lidskou isoformu CYP3A4. V závislosti na substrátu vykazoval totiž buďto inhibiční, nebo stimulační efekt. Výsledky studie ukazují, že sloučenina TRAM-34 také ovlivňuje cytochrom P450 a musí se dát proto pozor na potenciální lékové interakce. (Agarwal et al. 2013)

V další studii byl zkoumán vliv TRAM-34 na leukemické buňky HL-60. Dle závěru studie může TRAM-34 inhibovat proliferaci leukemických buněk HL-60 a je schopný navodit jejich buněčnou smrt. Roli hrála koncentrace TRAM-34 a doba jeho působení. (Jiang a Huang 2017)

3.5 INDOMETHACIN

Při pokusech jsme používali i derivát kyseliny octové – indomethacin. Chemický název látky je 2-{1-[4-chlorfenyl]karbonyl}-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl}octová kyselina (obrázek 8). Indomethacin je léčivo ze skupiny nesteroidních antiflogistik, používá se pro své antiflogistické, analgetické a antipyretické účinky. Léčivo však vykazuje i řadu nežádoucích účinků, proto se musí k terapii indomethacinem přistupovat velice obezřetně. (Doležal et al. 2013, Lüllmann et al. 2004)

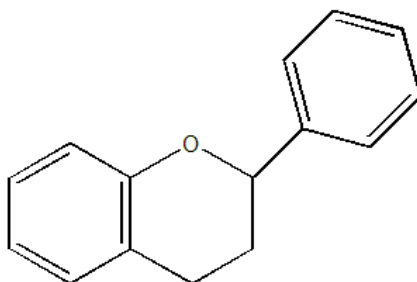


Obr. 8 Indomethacin

Mechanismus účinku indomethacinu spočívá v inhibici enzymu cyklooxygenázy (COX), o jehož vazebné místo indomethacin soutěží s kyselinou arachidonovou. Kyselina arachidonová se vyskytuje v malém množství spolu s dalšími mastnými kyselinami v biologických membránách. Působením COX na kyselinu arachidonovou vznikají cyklické endopeptidy – prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany. Rozlišujeme dvě hlavní isoformy cyklooxygenázy – COX-1 a COX-2. Působení COX-1 na kyselinu arachidonovou probíhá za fyziologických podmínek, vznikají tak prostaglandiny s ochrannou funkcí v řadě tkání. Naproti tomu COX-2 se uplatňuje při rozvoji zánětlivé reakce, touto cestou vznikající prostaglandiny vyvolávají vasodilataci, zvyšují permeabilitu cév s následným výstupem tekutin. Indomethacin je neselektivní inhibitor cyklooxygenázy, to znamená, že inhibuje obě isoformy cyklooxygenázy. Inhibice COX-2 indomethacinem vede ke snížení tvorby mediátorů zánětu, tento děj tedy zajišťuje jeho protizánětlivé působení. Inhibice COX-1 však zablokuje tvorbu ochranných prostaglandinů, projeví se to nežádoucími účinky léčiva, např. v gastrointestinálním traktu. (Doležal et al. 2013, Lüllmann et al. 2004)

3.6 FLAVONOIDY

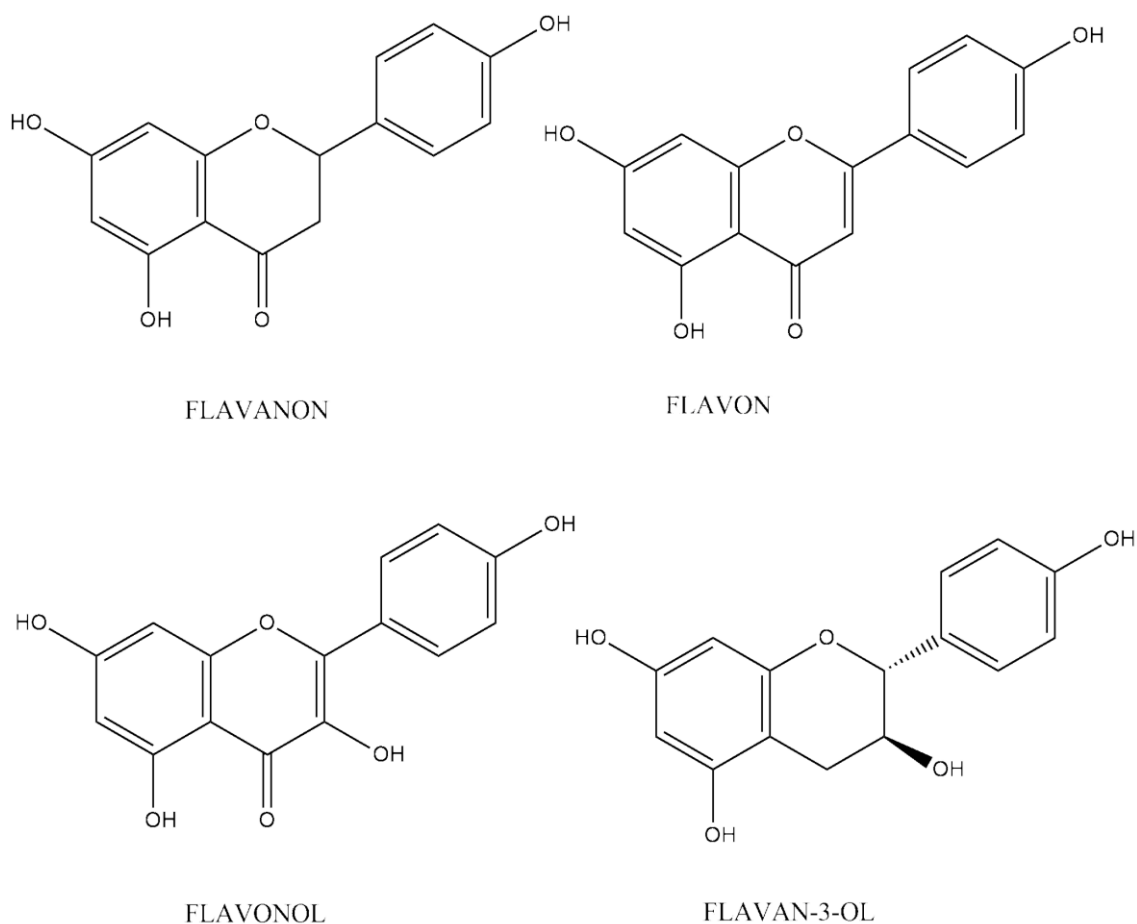
Flavonoidy patří k nejrozšířenějším sekundárním metabolitům rostlin. Jedná se o deriváty flavanu (2-fenylchromanu) – obrázek 9. V některé literatuře je také možné nalézt pojem flavanoidy – užívá se v případě, pokud je pyranový kruh maximálně nasycený. V některých studiích se k flavonoidům řadí i isoflavonoidy, to jsou však deriváty 3-fenylchromanu. Flavonoidy se dělí do několika skupin na základě stupně oxidace pyranového kruhu. V literárních pramenech se flavonoidy nejčastěji rozdělují na flavanony, flavony, flavonoly, flavan-3-oly a proanthocyanidiny. Jednotliví zástupci flavonoidů se vzájemně liší polohou a počtem substituentů na fenylchromanové kostře. V rostlinách se většinou vyskytují s glykosidickou vazbou, nacházejí se rozpuštěné v buněčné šťávě ve vakuolách. Flavonoidy tvoří obvykle velké molekuly. Z hlediska aplikace je proto vhodné je podávat v mikronizované podobě, snáze se pak vstřebávají. Vstřebání lze také podpořit souběžným podáním kyseliny askorbové (vitamínu C). Flavonoidy navíc zesilují účinek vitamínu C, proto lze tuto kombinaci s výhodou podat při léčbě infekčních onemocnění. (Opletal 2016, Rutar 2018, Spilková et al. 2016)



Obr. 9 flavan = 2-fenylchroman

Flavanony jsou prekurzorem ostatních flavonoidů. Nejdůležitějšími zástupci této skupiny jsou hesperidin a naringenin. Vyskytují se především v citrusových plodech a rajčatech. Flavony se v ovoci a zelenině nacházejí v nižších koncentracích než ostatní flavonoidy. Můžeme je najít např. v třešních, borůvkách, celeru či petrželi. Hlavními představiteli flavonů jsou luteolin a apigenin. Nejdůležitějšími zástupci flavonolů jsou kvercetin, kempferol a rutin. Flavonoly se vyskytují např. v cibuli, brokolici, jablkách, hroznovém víně, citrusových plodech a v zeleném čaji. Flavan-3-oly tvoří katechinové sloučeniny. Jedná se o předstupeň proanthocyanidinů, přírodních bezbarvých flavanolů. Na rozdíl od jiných tříd flavonoidů se v potravě

nenachází s glykosidickou vazbou. Flavanoły lze najít v kakau, čaji, víně. Jednotlivé typy vyjmenovaných flavonoidů jsou na obrázku 10. (Millar et al. 2017, Opletal 2016, Viskupičová et al. 2008)



Obr. 10 Typy flavonoidů

Modifikováno z: Opletal (2016)

Flavonoidy mají řadu biologických účinků, jejich terapeutické využití je velice široké. Významnou vlastností flavonoidů je jejich antioxidační působení na základě vychytávání volných radikálů. Pro volné radikály je typická přítomnost alespoň jednoho nepárového elektronu, jsou proto vysoce reaktivní. V případě velkého množství volných radikálů v organismu jsou flavonoidy schopné inhibovat jejich reaktivitu. Flavonoidy dokonce inhibují v těle různé enzymy, které se účastní reakcí, při nichž dochází ke vzniku volných radikálů. Vede to ke snížení oxidačního stresu. K oxidačnímu stresu v organismu typicky dochází při nádorovém či kardiovaskulárním onemocnění, dále v procesu stárnutí. Oxidační stres může vést k vážnému poškození jater. Flavonoidy

proto mohou být, díky svému antioxidačnímu působení, pro organismus obrovským přínosem. (Douglas et al. 2017, Mahmoud et al. 2019, Opletal 2016, Slonková 2017, Spilková et al. 2016)

Se snížením oxidačního stresu souvisí další pozitivní účinek flavonoidů, a to je ovlivnění hladiny cholesterolu. Oxidace cholesterolu má zásadní roli v procesu vzniku aterosklerózy, která je příčinou řady kardiovaskulárních chorob. Flavonoidy zabraňují oxidaci rizikového LDL-cholesterolu, případně blokují enzym, který řídí syntézu cholesterolu. Zjistilo se, že v procesu aterosklerózy je velice důležitá i hladina „dobrého“ HDL-cholesterolu. Pro léčbu aterosklerózy je důležité snížit hladinu LDL-cholesterolu, stejně důležité je však zvýšit hladinu HDL částic. Studie ukázaly, že flavonoidy mají schopnost plazmatické hladiny HDL-cholesterolu zvyšovat. Dále zesilují aktivitu paraoxonázy 1, což je enzym, který chrání LDL i HDL částice před oxidací. Bohužel flavonoidy těchto účinků dosahují až v dávkách mnohem vyšších, než jaké přijímáme v potravě. Řešením by proto bylo přijímat flavonoidy ve vyšších dávkách jako nutraceutika. (Millar et al. 2017, Potužák 2010)

Pro svůj pozitivní účinek na cévní systém se flavonoidy používají v terapii chronické žilní insuficience. V terapii jsou efektivní zejména pro své protizánětlivé působení, zvýšení žilního tonu a snížení permeability kapilár. Zjistilo se, že důležitou roli v kontrole permeability kapilár hraje vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), přičemž užívání mikronizované purifikované flavonoidní frakce výrazně snižuje hladiny VEGF v plazmě. Některé flavonoidy mají pozitivní vliv na tok lymfy a snížení viskozity krve. U pacientů s chronickou žilní chorobou vedou všechny tyto účinky k poklesu tvorby otoků a zmírňuje se bolest. Flavonoidy také vykazují mírný vasodilatační účinek, který můžeme vysvětlit zvýšením produkce prostaglandinů a NO a zároveň poklesem vtoku Ca^{2+} do buněk hladkého svalstva. S vasodilatací je úzce spojený i antihypertenzní účinek flavonoidů. Flavonoidy dále oslabují účinky aldosteronu, zvyšují dostupnost bradykininu a působí antagonisticky na adenosinové receptory, což také vede ke snížení krevního tlaku. Další významnou vlastností flavonoidů ovlivňující cévní systém je jejich antitrombotické působení – znemožňují agregaci krevních destiček. (Nagy et al. 2017, Slonková 2017)

3.6.1 Metabolismus flavonoidů

Mnoho studií se zabývá účinky samotných flavonoidů. Existuje daleko méně studií, které zohledňují metabolismus flavonoidů, přičemž účinky výsledných metabolitů se mohou značně lišit od účinků původních flavonoidů. Také je potřeba zohlednit cestu flavonoidu organismem po jeho metabolizaci. Buňky živého organismu musí být schopné daný metabolit dále zpracovat, aby mohl být zajištěn jeho účinek. (Spencer et al. 2003)

Flavonoidy se v potravě vyskytují nejčastěji s glykosidickou vazbou, přičemž daný sacharid a poloha jednotlivých substituentů jsou důležitými faktory pro střevní absorpci. Před absorpcí flavonoidu musí nejprve dojít k jeho deglykosylaci. Hydrolýza sacharidové kostry je zprostředkována cytoplazmatickou β -glukozidázou. Deglykosylaci dochází ke zvýšení hydrofobicity flavonoidního aglykonu. Sloučenina tak může přejít přes epiteliální buňky střeva pasivní difúzí. Ukázalo se však, že některé flavonoidy procházejí přes střevní epitel aktivním transportem. Proto není u těchto flavonoidů nutná deglykosylace, přítomnost glykosidické vazby jim pro přestup střevním epitelem nevadí. Takovým zástupcem je např. kvercetin-4-glukosid. (Viskupičová et al. 2008)

Absorbované flavonoidy se vážou na albumin a portální žilou jsou transportovány do jater. Játra jsou sice stěžejní orgán pro metabolizaci, transformační reakce však probíhají již ve střevě, případně také v ledvinách. Nejhojnější metabolická reakce flavonoidů je konjugace se sulfátem či kyselinou glukuronovou. Dále mohou podléhat oxidačně-redukčním reakcím nebo hydrolýze. Všechny tyto reakce mají zásadní dopad na účinky flavonoidů. Důsledkem metabolizace je snížení počtu volných hydroxylových skupin, jejichž významnou vlastností je interakce s důležitými receptory, enzymy. (Viskupičová et al. 2008)

Konjugáty se z části vylučují močí a z části se vrací prostřednictvím žluči zpět do střev, kde mohou být bakteriální mikroflórou rozštěpeny na menší molekuly (např. na deriváty kyseliny octové, propionové či benzoové). Příkladem může být metabolit kvercetinu – kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová. (Nagy et al. 2017, Spencer a Crozier 2012, Viskupičová et al. 2008)

Flavan-3-oly jsou jedinou podtřídou flavonoidů, která se v potravě nevyskytuje glykosidicky vázaná. V lidské potravě jsou zastoupeny nejhojněji, o jejich metabolismu

a absorpci se ví však málo. Katechin, epikatechin a epigallokatechin jsou absorbovány především v tenkém střevě – v jejunu a ileu. (Viskupičová et al. 2008)

3.6.2 Metabolismus kvercetinu

Kvercetin je jeden z nejvíce zkoumaných flavonoidů. Uvádí se, že má cytotoxický efekt, kterého dosahuje indukcí apoptózy. Dále má protizánětlivé účinky, antioxidační účinky a s tím spojenou ochranu proti oxidačnímu stresu. Některé studie uvádějí i protinádorovou aktivitu kvercetinu. (Skrbek et al. 2009, Spencer et al. 2003)

Metabolizace kvercetinu v živém organismu je velice intenzivní, tento flavonoid má velké množství metabolitů. V cirkulaci ho můžeme najít především ve formě glukuronidů, sulfátů, dále v podobě *ortho*-methylovaného kvercetinu (např. 3-*o*-methylkvercetin, 4-*o*-methylkvercetin) či *ortho*-methylovaného glukuronidu (např. kvercetin 7-*o*- β -D-glukuronid). Všechny vyjmenované sloučeniny vznikají po metabolizaci daného flavonoidu v tenkém střevě a následně v játrech. Na metabolismu kvercetinu se však podílí i mikroflóra v tlustém střevě. Pak dochází k tvorbě hydroxyfenylacetátu (např. kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová). (Spencer et al. 2003)

Jedna ze studií hodnotila metabolismus kvercetinu u přežvýkavců. Opět došlo k potvrzení, že je tento flavonoid silně metabolizován. Zajímavostí zde bylo, že po přeměně samotného kvercetinu byly v organismu přežvýkavce přítomny dva hlavní metabolity – 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (3,4-DHPA) a 4-methylkatechol (4-MC). Dále se zjistilo, že vzrůstající množství 4-MC doprovázel pokles 3,4-DHPA. Předpokládá se proto, že 4-MC nejpravděpodobněji vzniká z kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové. (Berger et al. 2015, Scheline 1967)

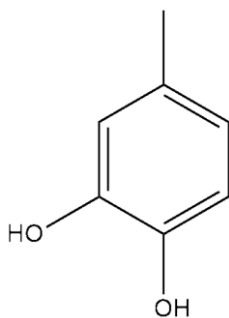
3.6.3 Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová

Jak práce uvádí již výše, 3,4-DHPA vzniká degradací kvercetinu bakteriální mikroflórou v tlustém střevě. Nejprve dochází k redukci dvojnásobné vazby kvercetinu na pozici 2,3, vzniklý meziprodukt je taxifolin. Pak pravděpodobně probíhá oxidační dekarboxylace za vzniku dvou metabolitů kvercetinu – floroglucinolu a 3,4-DHPA (viz obrázek 11). Po konzumaci stravy bohaté na flavonoidy je možné nalézt kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou v krevní plazmě a moči. (Carrasco-Pozo et al. 2015, Skrbek et al. 2009)

Zjistilo se také, že *in vivo* podmínkách 3,4-DHPA výrazně redukuje peroxidaci plazmatických lipidů. Dále byly prováděny pokusy spolu s cholesterolem. Vyšší hladina cholesterolu může vést k poškození β -buněk pankreatu, což má za následek rozvoj diabetu a s ním spojené přidružené choroby. Ve studii se ukázalo, že 3,4-DHPA chrání pankreatické buňky před poškozením cholesterolem. Výsledky však závisely na dávce 3,4-DHPA a na množství cholesterolu. Při vyšších hladinách cholesterolu samotná kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová již nedokázala poškození buněk zabránit. Ačkoliv je důležité provedení dalších studií, zdá se, že kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová by mohla být užívána k zabránění rozvoji diabetu z prediabetu. (Carrasco-Pozo 2015)

3.6.4 4-Methylkatechol

4-Methylkatechol (obrázek 12) je metabolit kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové, vzniká její dekarboxylací. (Berger et al. 2015, Scheline 1967)



Obr. 12 4-Methylkatechol

4-Methylkatechol je známý jako potenciální inhibitor růstu nádorových buněk. Jedna ze studií zjistila, že by tato látka mohla být užívána pro léčbu inzulinomu. Inzulinom je nádor beta buněk pankreatu, většinou bývá benigní. Je pro něj typická zvýšená sekrece inzulinu a charakterizuje jej hypoglyémie nalačno. Studie přišla s výsledkem, že 4-MC způsobuje apoptózu buněk inzulinomu. (Karatug Kacar et al. 2018, Zamrazil 2007)

4-MC je významnou sloučeninou pro nervový systém. Ukázalo se, že je induktorem důležitých neurotrofických faktorů – nervového růstového faktoru (NGF = *nerve growth factor*) a mozkového neurotrofického faktoru (BDNF = *brain-derived neurothrophic factor*). Tyto faktory jsou podstatné pro vznik a regeneraci neuronů,

pro přežití neuronů. Přítomnost těchto látek v organismu může snížit výskyt neurologických obtíží. Využití NGF a BDNF v terapii je však limitované – jedná se o velké molekuly, které by po aplikaci nedokázaly projít mozkovou bariérou. Hledají se proto jiné možnosti léčby a jednou z nich je využití 4-MC. 4-Methylcatechol podporuje syntézu NGF a BDNF. Jedna ze studií prokázala, že aplikace 4-MC pomáhá, po vyvolaném poranění nervového systému, regenerovat zejména malé neurony – např. v kůži. (Kaiser et al. 2016, Li et al. 2017, Yu-Lin et al. 2009)

Oba neurotrofiny byly objeveny i ve varlatech, jsou důležité pro reprodukci. NGF ve varlatech podporuje proliferaci Leydigových buněk a zvyšuje produkci steroidů. Vzhledem k tomu, že je dokázané pozitivní působení 4-MC na zmíněné neurotrofiny v neuronech, vědci si pokládali otázku, zda je 4-MC schopný ovlivnit syntézu NGF a BDNF v pohlavním systému. Byla provedena studie zabývající se tímto problémem. Ukázalo se, že 4-MC neovlivnil hladinu neurotrofinů ve varlatech. Z výsledku plyne, že stimulace syntézy neurotrofických faktorů 4-methylcatecholem je pravděpodobně specifická pro nervovou tkáň. Studií se však zjistilo, že 4-MC značně inhiboval proliferaci Leydigových buněk, navíc vykazoval apoptotické působení. Také došlo k výraznému poklesu sekrece testosteronu. Vše bylo pravděpodobně způsobené snížením mitochondriální aktivity vlivem 4-methylcatecholu. (Li et al. 2017)

4 CÍL PRÁCE

Cílem rigorózní práce bylo ověření několika možných mechanismů vasodilatačního účinku dvou vybraných metabolitů flavonoidů, kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové a 4-methylcatecholu. K tomu účelu byla použita metoda izolované aorty potkana *ex vivo*.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Materiál

5.1.1 Pomůcky a přístroje

- Laboratorní váhy Kern, analytické váhy Explorer Analytical
- Laboratorní sklo – kádinky, odměrný válec, Petriho miska, tyčinky, zkumavky
- Jiné laboratorní pomůcky – buničitá vata, lžičky, mikrozkušavky (typu Eppendorf), pinzety, pipety + špičky, stříkačky
- Operační nástroje – operační stolek, sterilní jehly, nůžky, pean
- Aparatura na izolované orgány - *Multi chamber tissue bath systém* (obrázek 13)
- Počítač a vyhodnocovací software - *S.P.E.L. Advanced Kymograph Software* v. 3.2
- Termostat U1
- Plynová bomba s pneumoxidem = směs O₂ (95%) a CO₂ (5%)



Obr. 13 Aparatura na izolované orgány

Zdroj: Laboratoř Katedry farmakologie a toxikologie na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové
Univerzity Karlovy

5.1.2 Chemikálie

Rozpouštědla

Destilovaná voda

Dimethylsulfoxid byl zakoupen ze společnosti Sigma-Aldrich (Německo).

96% ethanol – dodavatelem byla společnost Penta s.r.o.

Krebs-Henseleitův živný roztok (tabulka 1)

Surovina	Vzorec	Množství látky v gramech	Výrobce
Chlorid sodný	NaCl	3,878	Penta s.r.o.
Chlorid draselný	KCl	0,245	LACHEMA a.s.
Chlorid vápenatý	CaCl ₂	0,196	LACHEMA a.s.
Hydrogenuhličitan sodný	NaHCO ₃	1,47	Penta s.r.o.
Dihydrogenfosforečnan draselný	KH ₂ PO ₄	0,112	Dr. Kulich Pharma s.r.o.
Síran hořečnatý heptahydrát	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,203	LACHEMA a.s.
Glukóza	C ₆ H ₁₂ O ₆	1,47	Penta s.r.o.

Tab. 1 Složení Krebs-Henseleitova živného roztoku – uvedené navážky jsou platné pro přípravu 0,7 litru roztoku

Zdroj: Laboratoř Katedry farmakologie a toxikologie na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové Univerzity Karlovy

Látky ovlivňující cévu

Indomethacin, noradrenalin, nitroprussid sodný dihydrát a TRAM-34 byly zakoupeny ze společnosti Sigma-Aldrich (Německo).

UCL-1684 byl zakoupen z Velké Británie ze společnosti Tocris Bioscience.

Anestetikum

Urethan byl získán z Německa ze společnosti Sigma-Aldrich.

5.1.3 Testované látky

Látka	Vzorec	Molární hmotnost	Výrobce
Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová	$C_8H_8O_4$	168,15 g/mol	Sigma-Aldrich, Německo
4-methylcatechol	$C_7H_8O_2$	124,14 g/mol	Sigma-Aldrich, Německo

Tab. 2 Testované látky

Modifikováno z: www.sigmaaldrich.com

5.1.4 Testovaná zvířata

Testování probíhalo na bílých potkanech rodu Wistar:Han (Charles River, Düsseldorf, Německo). Před experimentem byli potkani umístěni ve viváriu na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Ve viváriu jsou potkani chováni v nejvýše pětičlenných skupinkách za standardních podmínek (teplota v rozmezí 23-25°C, 12-hodinový cyklus světlo/tma) a mají volný přístup k standardní potravě a pitné vodě. K experimentu byli použiti samci o hmotnostech 350 – 550 g.

Všechny experimenty byly prováděny v souladu se Zákonem České národní rady na ochranu zvířat proti týrání (č. 246/1992 Sb.), se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a se schváleným projektem pokusu (reg. No. MSMT-7041/2014-10).

5.2 Metodika

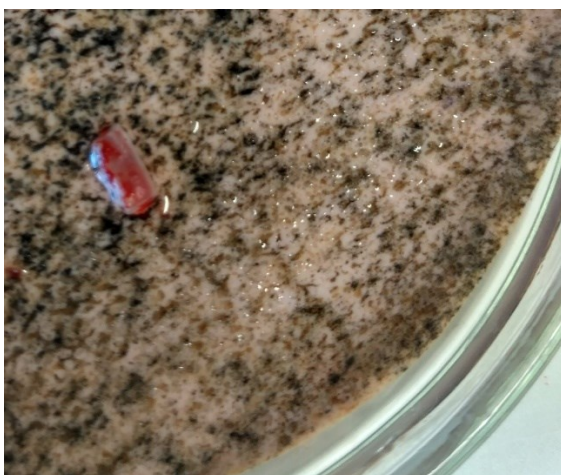
5.2.1 Příprava Krebs-Henseleitova živného roztoku

Do odměrného válce jsme si odlili 0,7 litru destilované vody. Suroviny z tabulky 1 jsme rozvážili do kádinek a spolu s destilovanou vodou jsme vytvořili příslušné roztoky. Připravené roztoky jsme pak slili do velké kádinky o objemu 2 litry, roztok chloridu vápenatého jsme přidali vždy až naposled, aby nedošlo k vysrážení slabých vápenatých solí. Připravený živný roztok jsme poté nalili do lázní aparatury.

5.2.2 Průběh experimentu

Na začátku experimentu byla potkanovi podána anestezie intraperitoneální cestou. Podávaným anestetikem byl urethan ($1,2 \text{ g kg}^{-1}$), jehož metabolity jsou toxické, je tedy zajištěno, že se zvíře neprobudí. Anestezie začala účinkovat asi po pěti minutách. Poté byl potkan připevněn na operační stůl. Byla nastřížena kožní řasa na břicho a potkan byl usmrčen vykrvením z břišní aorty.

Po vykrvení potkana byl vypreparován úsek hrudní aorty o délce asi dva centimetry a opatrně opláchnut od krve v Krebs-Henseleitově živném roztoku. Následně byl na Petriho misce s Krebs-Henseleitovým živným roztokem šetrně zbaven zbytku pojivové tkáně a rozdělen na čtyři menší části (kroužky) o velikosti cca 0,3 cm, které byly následně použity k vlastnímu testování (obrázek 14).



Obr. 14 Část hrudní aorty potkana na Petriho misce

Zdroj: Laboratoř Katedry farmakologie a toxikologie na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové
Univerzity Karlovy

Před pokusem byla do provozu uvedena plynová bomba, aby do aparatury s Krebs-Henseleitovým živným roztokem mohl proudit pneumoxid a pomocí termostatu byla udržována teplota $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Zajistilo se tak vhodné prostředí pro testovanou cévu, jež připomínalo fyziologické podmínky. Kousky aorty se zavěsily na dva protilehlé ocelové háčky, pomocí chirurgické nitě byly spojeny s převodním zařízením aparatury. Navozená zátěž je převedena na změnu napětí a zobrazena na počítači pomocí software. Toto uspořádání umožňuje sledovat kontrakci nebo dilataci tkáně.

Stabilizace tkáně

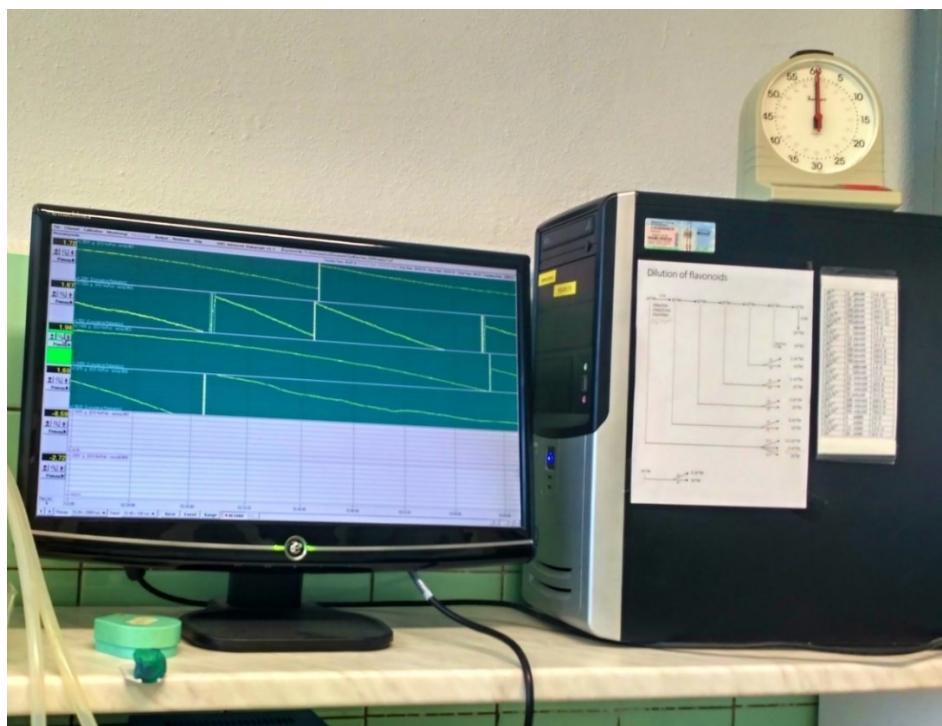
Před vlastním pokusem proběhla stabilizace tkáně. Postupně se na všech čtyřech vzorcích v aparatuře nastavila úvodní zátěž 2 gramy. Po nastavení zátěže se tkáň

nechala volně relaxovat a byly prováděny výplachy živného roztoku v pravidelných desetiminutových intervalech. Takto byly provedeny 3 výplachy, 4. výplach (ve 40. minutě) byl proveden s již přesně odměřenými 5 mililitry Krebs-Henseleitova živného roztoku. Přesné množství bylo podmínkou pro následné správné podání požadovaných koncentrací vasoaktivních látek.

Vlastní pokus

Mechanismus vasodilatačního účinku kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové a 4-methylkatecholu byl zkoumán pomocí antagonistů. Ve 45. minutě pokusu byla do živného roztoku přidána látka, jejímž úkolem bylo zablokovat určitý mechanismus. V našem případě byl podán indomethacin (výsledná koncentrace v lázni 10 μM) nebo kombinace sloučenin TRAM-34 a UCL-1684 (10 μM a 1 μM) nebo samotný TRAM-34 (10 μM). Inkubace vždy trvala 30 minut.

Následně byla navozena prekontrakce noradrenalinem (10 μM). Po stabilizaci (asi 45 minut) byla do roztoku kumulativně přidána testovaná látka 4-methylkatechol nebo 3,4-DHPA. Výsledné koncentrace v lázni byly 100 nM – 1 mM. Další koncentrace byla přidána vždy až poté, co došlo k ustálení odpovědi na předchozí aplikaci. Hodnoty byly pozorovány pomocí softwaru (obrázek 15) a zaznamenávány do tabulky.



Obr. 15 Ukázka zaznamenávání hodnot v softwaru

Zdroj: Laboratoř Katedry farmakologie a toxikologie na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové Univerzity Karlovy

Na závěr každého experimentu byl přidán nitroprussid sodný (10 μM), který navodil kompletní relaxaci cévy. U části vzorků pokus proběhl bez přítomnosti antagonisty.

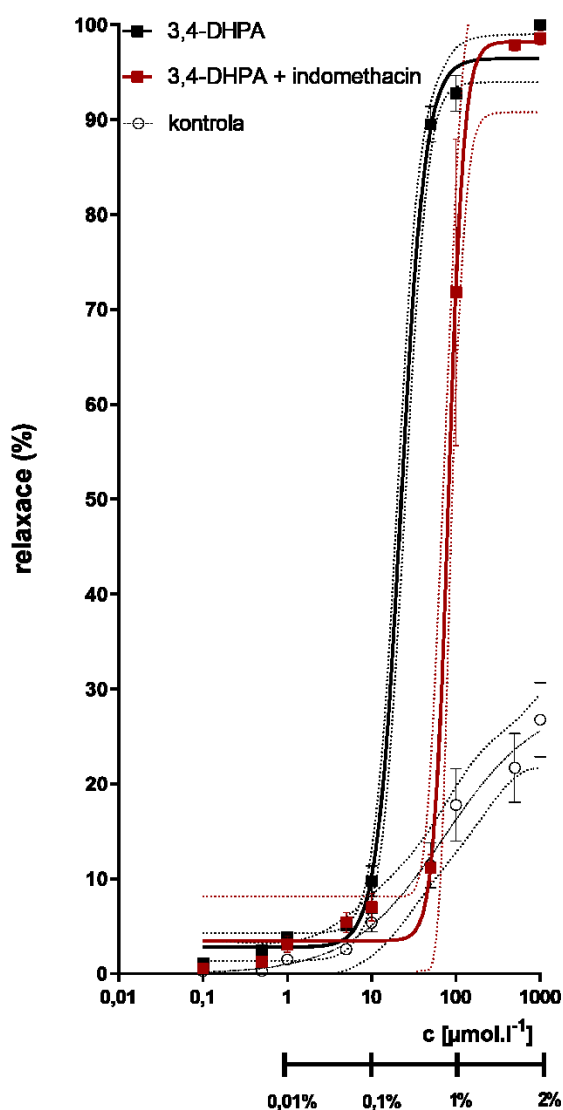
Vyhodnocení výsledků

Hodnoty, které byly při experimentu získány, jsme vyhodnotili za pomoci počítačových programů GraphPad Prism 5 a Excel. Sestrojili jsme relaxační křivky CRC s konfidenčními intervaly 95 %, na nichž je znázorněn vasorelaxační účinek 4-methylcatecholu či 3,4-DHPA na aortu potkana, vyjádřený v procentech. Křivky znázorňují závislost relaxace aorty na koncentraci testované látky. Je vytvořena jak křivka s testovaným metabolitem kvercetin, tak křivka se současným použitím antagonisty. Spočítali jsme hodnoty maximální relaxace a EC_{50} , které jsme spolu s odchylkami SEM zanesli do tabulky. EC_{50} představuje koncentraci látky, která vyvolá 50 % relaxaci cévy.

..

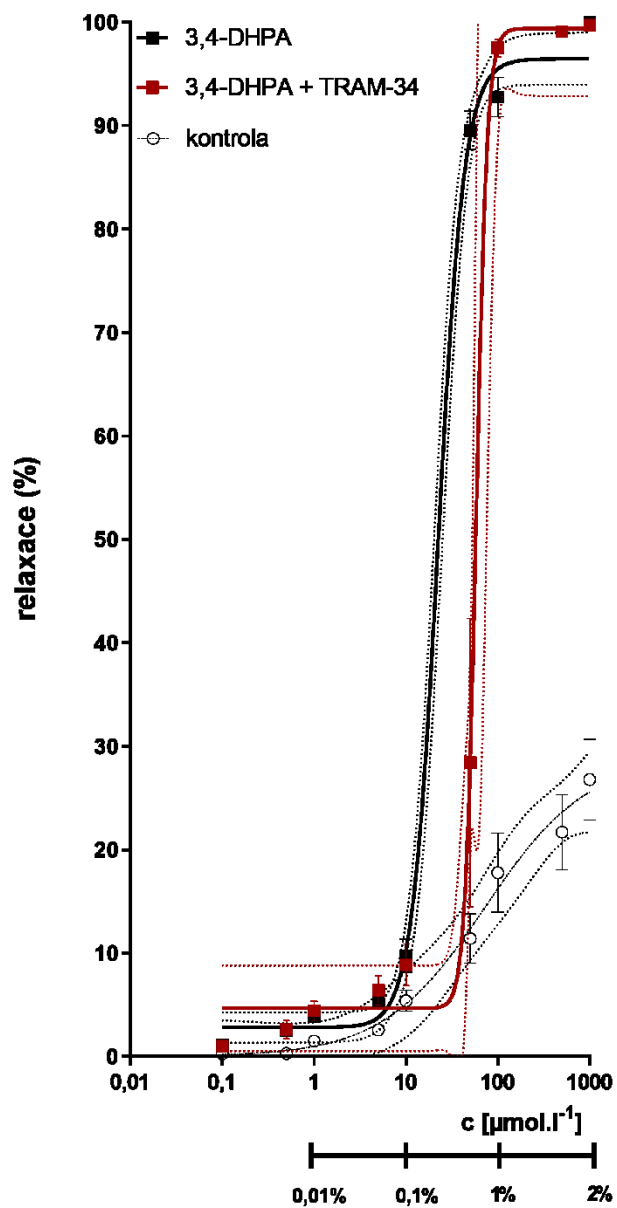
6 VÝSLEDKY

Inhibice cyklooxygenázy pomocí indomethacinu i inhibice Ca^{2+} aktivovaných K^+ kanálů pomocí TRAM-34 nebo kombinací TRAM-34 s UCL-1684 posunuly vasorelaxační křivku 3,4-DHPA signifikantně směrem doprava (obr. 16, 17, 18). V případě 4-methylkatecholu po inkubaci indomethacinem k žádnému posunu nedošlo. Při použití TRAM-34 byly změny nejednoznačné a křivka se v jednom případě dokonce posunula směrem doleva (viz obr. 19, 20, 21). Hodnoty EC_{50} a maximální relaxace shrnují tabulky 3 a 4.



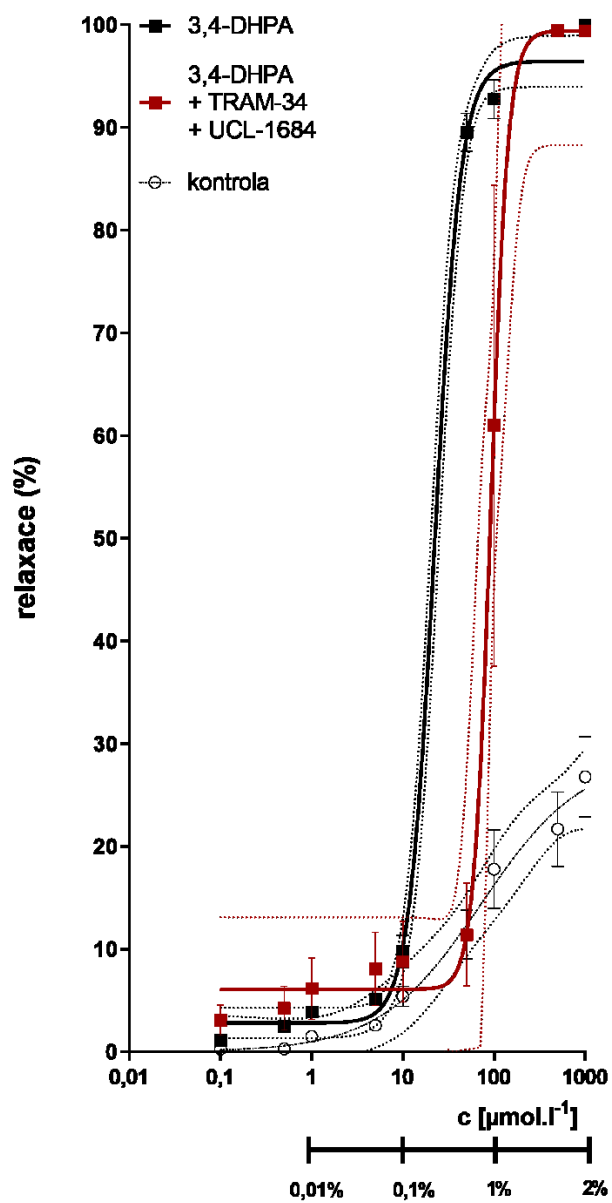
Obr. 16 Vasorelaxační účinek kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (3,4-DHPA) na aortu potkana *ex vivo* prekontrahovanou noradrenalinem za přítomnosti indomethacinu. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, počet vzorků $n=5$ (bez inhibitoru), $n=6$ (s indomethacinem), $n=6$ (kontrola).

Koncentrace DMSO je znázorněna pod osou x.



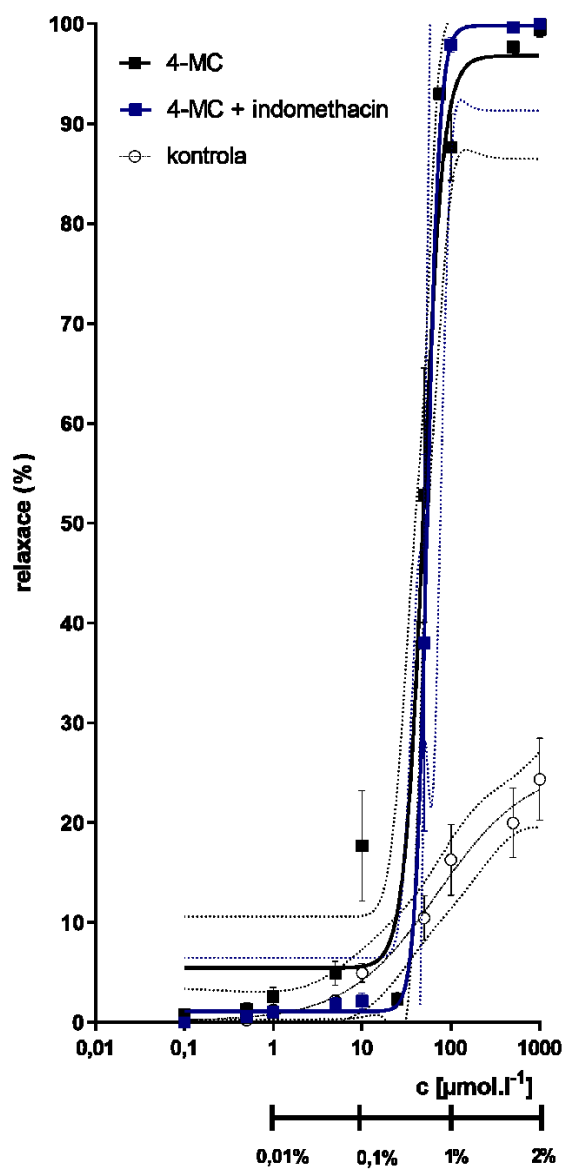
Obr. 17 Vasorelaxační účinek kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (3,4-DHPA) na aortu potkana *ex vivo* prekontrahovanou noradrenalinem za přítomnosti TRAM-34. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, počet vzorků $n=5$ (bez inhibitoru), $n=6$ (s TRAM-34), $n=6$ (kontrola).

Koncentrace DMSO je znázorněna pod osou x.



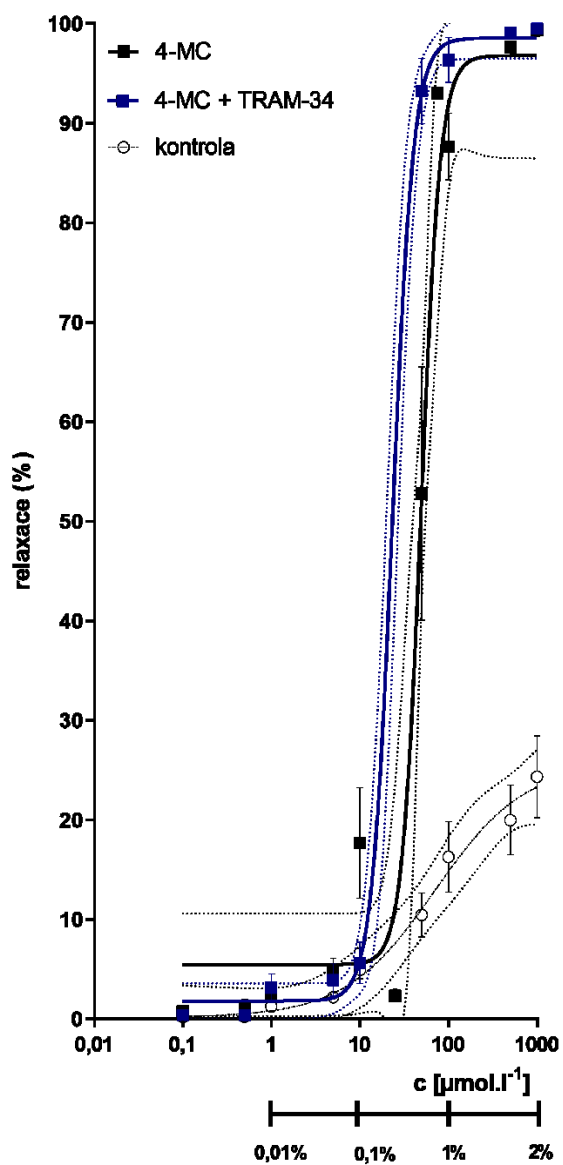
Obr. 18 Vasorelaxační účinek kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (3,4-DHPA) na aortu potkana *ex vivo* prekontrahovanou noradrenalinem za přítomnosti TRAM-34 a UCL-1684. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM, počet vzorků n=5 (bez inhibitoru), n=5 (TRAM-34 + UCL-1684), n=6 (kontrola).

Koncentrace DMSO je znázorněna pod osou x.



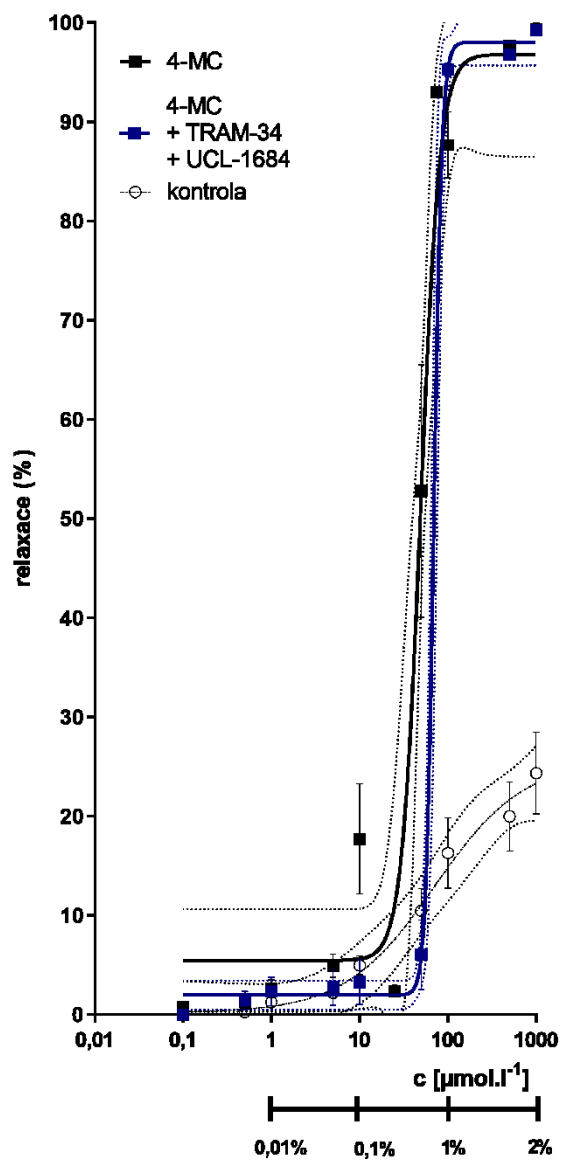
Obr. 19 Vasorelaxační účinek 4-methylcatecholu (4-MC) na aortu potkana *ex vivo* prekontrahovanou noradrenalinem za přítomnosti indomethacinu. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, počet vzorků $n=5$ (bez inhibitoru), $n=6$ (s indomethacinem), $n=7$ (kontrola).

Koncentrace DMSO je znázorněna pod osou x.



Obr. 20 Vasorelaxační účinek 4-methylcatecholu (4-MC) na aortu potkana *ex vivo* prekontrahovanou noradrenalinem za přítomnosti TRAM-34. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM, počet vzorků n=5 (bez inhibitoru), n=4 (s TRAM-34), n=7 (kontrola).

Koncentrace DMSO je znázorněna pod osou x.



Obr. 21 Vasorelaxační účinek 4-methylcatecholu (4-MC) na aortu potkana *ex vivo* prekontrahovanou noradrenalinem za přítomnosti TRAM-34 a UCL-1684. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM, počet vzorků $n=5$ (bez inhibitoru), $n=4$ (s TRAM-34 + UCL-1684), $n=7$ (kontrola).

Koncentrace DMSO je znázorněna pod osou x.

	Maximální relaxace [%]	EC ₅₀ [μM]
3,4-DHPA	96,5 ± 1,2	22,4 ± 1,3
3,4-DHPA + indomethacin	98,2 ± 3,7	82,3 ± 5,5*
3,4-DHPA + TRAM-34	99,4 ± 3,3	58,2 ± 5,8*
3,4-DHPA + TRAM-34 + UCL-1684	99,4 ± 5,5	92,5 ± 8,1*

Tab. 3 Vasodilatační účinek kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (3,4-DHPA) na aortu potkana *ex vivo* po prekontrakci noradrenalinem vyjádřený jako maximální relaxace a EC₅₀.

* Signifikantní rozdíl proti 3,4-DHPA

	Maximální relaxace [%]	EC ₅₀ [μM]
4-methylkatechol	96,8 ± 5,1	49,1 ± 3,3
4-methylkatechol + indomethacin	99,8 ± 4,2	54,2 ± 4,6
4-methylkatechol + TRAM-34	98,6 ± 1,0	23,3 ± 1,9*
4-methylkatechol + TRAM-34 + UCL-1684	98,0 ± 1,1	69,3 ± 3,1*

Tab. 4 Vasodilatační účinek 4-methylkatecholu na aortu potkana *ex vivo* po prekontrakci noradrenalinem vyjádřený jako maximální relaxace a EC₅₀.

* Signifikantní rozdíl proti 4-methylkatecholu.

7 DISKUSE

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou celosvětově nejčastější příčinou úmrtí. Příčiny vzniku KVO jsou různé, největší problém však představuje ateroskleróza a následný rozvoj metabolického syndromu. Rizikovými faktory pro vznik KVO jsou špatné stravovací návyky (konzumace potravin s vysokým obsahem tuků a cukrů, kouření, nadměrný příjem alkoholu) a nedostatečná fyzická aktivita. Při včasné zachytu onemocnění kardiovaskulárního systému je proto v první řadě nejdůležitější nefarmakologická léčba. Pokud pacient kouří, měl by se zlozvykem přestat, to samé se týká nadměrného požívání alkoholu. Pacient by měl méně solit, měl by si hlídat nutriční příjem, konzumovat velké množství ovoce, zeleniny. Pacient by měl do svého života zařadit více pohybových aktivit. Pokud nefarmakologická léčba již nestačí, doplňujeme ji farmakologickou léčbou. Na trhu je velké množství léčivých přípravků, u nichž je prokázáno, že značně zlepšují kvalitu života pacientů s KVO. Medicína by se však měla posouvat dále dopředu a vzhledem k obrovskému rozšíření KVO je třeba vyvíjet také nová léčiva. Ideálně by mělo jít o léčivé přípravky s lepšími léčebnými účinky a s nižším výskytem nežádoucích účinků. (Lopez a Jan 2019, WHO 2017)

Jak je již zmíněno, pro zdraví je velice prospěšná konzumace velkého množství ovoce a zeleniny. Tyto potraviny obsahují řadu prospěšných látek jako jsou vitamíny, minerály, vláknina či flavonoidy. Je proto opodstatněné uvažovat nad tím, zda by zdroji nových léčiv nemohly být právě tyto přírodní látky. Existuje velké množství odborných studií, které přesvědčivě dokazují, že flavonoidy mají mnoho pozitivních účinků na lidský organismus, např. dlouho známé jsou antioxidační a antiflogistické účinky. Tyto účinky jsou velmi pravděpodobně komplexní. Protizánětlivé působení je již z části prozkoumáno a víme, že je zprostředkováno různými cestami. Jeden způsob je inhibice aktivity či syntézy prozánětlivých enzymů, jako jsou cyklooxygenáza či lipoxygenáza. Kromě toho flavonoidy mohou zvyšovat aktivitu antioxidačních enzymů, např. katalázy. Antioxidační účinek je klasicky založen na vychytávání volných radikálů. Tyto mechanismy se mohou podílet na dalších pozitivních účincích flavonoidů – snižování krevního tlaku, snižování hladiny cholesterolu či ovlivnění permeability kapilár. (Marunaka et al. 2017, Opletal 2016, Potužák 2010, Slonková 2017)

Protože k dosažení významného efektu je obvykle potřeba většího množství daného flavonoidu, než jaké přijímáme běžnou stravou, v terapii některých onemocnění se již přistoupilo k podávání flavonoidů ve formě potravinových doplňků či dokonce

registrovaných léčiv. Výsledky takové terapie jsou předmětem řady klinických zpráv a studií. Názorným příkladem v oblasti potravinových doplňků je flavonoid kvercetin, kdy se odhaduje, že běžným stravováním denně přijímáme 3 - 40 mg kvercetinu. Denní dávka kvercetinu v doplňcích stravy se však většinou pohybuje kolem 500 mg. Příkladem registrovaného léčivého přípravku může být známé venofarmakum - Detralex (v některých zemích je registrován jako Daflon). Obsahuje kombinaci pěti různých flavonoidů. Obsažené flavonoidy se vzájemně potencují a přípravek má díky této skutečnosti vyšší účinnost. Ke zvýšení biologické dostupnosti flavonoidů v přípravku přispívá jejich zpracování při výrobě, jedná se o proces mikronizace. (Andres et al. 2018, Carrasco-Pozo et al. 2015, Černohorská 2018, Millar et al. 2017, Rutar 2018)

Omezením řady studií a tím i dalšího využití v terapii, je fakt, že se mnohdy zabývají pouze působením samotných flavonoidů. Dnes je již jasné, že flavonoidy jsou v těle intenzivně metabolizovány a původní parentní látka s předpokládanými účinky může mít paradoxně i velmi nízkou biodostupnost. Je proto potřeba zohlednit metabolismus těchto látek, a to ze dvou hlavních důvodů. (1) Konečný účinek je pravděpodobně silně ovlivněn (ne-li přímo určen) působením vzniklých metabolitů, které se mohou farmakologicky i výrazně odlišovat od původní sloučeniny. (2) Mezi jednotlivými pacienty mohou být velké rozdíly, pokud se týká kvality i kvantity produkovaných metabolitů. U člověka bylo dosud identifikováno přibližně 200 proteinů, které mají vliv na metabolizaci flavonoidů. Aktivitu těchto proteinů ovlivňují mimo jiné věk, pohlaví, genotyp a případná přidružená onemocnění dané osoby, jsou již prokázány i etnické rozdíly. (Cassidy a Minihane 2017, Spencer et al. 2003)

Jedním z nejprobádanějších flavonoidů je kvercetin. Jak je popsáno výše, má protizánětlivé a antioxidační účinky. Ve velké míře se nyní zkoumá jeho vliv na krevní tlak. Ve studiích prováděných na lidech bylo zjištěno, že ke snížení systolického i diastolického krevního tlaku je potřeba přijmout 500 mg kvercetinu za den. Mezi pacienty však byly rozdíly jak v navozeném účinku, tak v potřebné dávce. Ukázalo se, že snížení krevního tlaku je značné především u pacientů s již projevenou hypertenzí, ale není příliš patrné u pacientů s tzv. prehypertenzí. U lidí trpících metabolickým syndromem se snížil systolický tlak již při příjmu 150 mg kvercetinu za den. Zatímco účinek na krevní tlak je již z části zdokumentovaný, mnohem méně víme o jeho mechanismu. Ze studií prováděných na zvířecích modelech je patrné, že látka způsobuje

relaxaci aorty. Podrobné vysvětlení mechanismu vasorelaxace však stále chybí. (Marunaka et al. 2017, Spencer et al. 2003)

Ukázalo se, že pro ovlivnění krevního tlaku kvercetinem je velice důležitý jeho způsob podání. Při perorálním podávání došlo nečekaně k výraznějšímu snížení krevního tlaku než při intraperitoneálním podávání. Je proto pravděpodobné, že pro účinek kvercetinu je důležitá jeho metabolizace v gastrointestinálním traktu a na vasorelaxaci a následném snížení krevního tlaku by se mohly podílet některé metabolity. (Galindo et al. 2012)

Při získávání výsledků pro rigorózní práci jsme sledovali mechanismus vasodilatačního působení dvou metabolitů kvercetinu na hrudní aortu potkana *ex vivo*. Jednalo se o kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou a 4-methylkatechol. U obou sledovaných metabolitů byl nejprve potvrzen relaxační účinek na stěnu hrudní aorty. Mechanismus vasorelaxačního působení byl testován pomocí inhibitorů. Prováděli jsme pokusy s inhibitorem cyklooxygenázy – indomethacinem a dále s inhibitory draslíkových kanálů aktivovaných vápníkem – TRAM-34 (inhibitor IK_{Ca}) a UCL-1684 (inhibitor SK_{Ca}).

U 3,4-DHPA byly výsledky jednoznačné. Použití indomethacinu, TRAM-34 či kombinace TRAM-34 + UCL-1684 výrazně snížilo vasorelaxační účinek 3,4-DHPA. Můžeme proto předpokládat, že na vasorelaxaci navozené 3,4-DHPA se podílejí jak cyklooxygenáza, tak některé podtypy draslíkového kanálu aktivovaného vápníkem. Inhibice navozená kombinací TRAM-34 + UCL-1684 byla účinnější, než samotný TRAM-34, ale rozdíl nebyl významný. Nicméně i tak by se na vasodilataci mohly podílet oba zmiňované typy draslíkového kanálu.

Při experimentu s 4-methylkatecholem nebyla přítomností indomethacinu vasorelaxační aktivita téměř ovlivněna, inhibice cyklooxygenázy je proto nepravděpodobná. Pokud se týká účasti draslíkových kanálů aktivovaných vápníkem, nezískali jsme jednoznačné výsledky. Při testování kombinace látek TRAM-34 s UCL-1684 došlo sice k nevýznamnému snížení vasorelaxační aktivity 4-MC, ale při použití TRAM-34 se vasorelaxační účinek 4-methylkatecholu paradoxně mírně zvýšil. Interpretace výsledků ohledně 4-methylkatecholu je proto obtížná. Práci by proto bylo vhodné doplnit dalšími pokusy, zejména těmi, které by sledovaly vliv inhibice pouze pomocí UCL-1684. (Pourová et al. 2018)

Tato rigorózní práce je součástí širšího výzkumu kardiovaskulárních účinků flavonoidů. U dostupných kolonických metabolitů flavonoidů byla nejprve jako screening testována schopnost vasorelaxace *ex vivo* na aortě potkana. Z testovaných metabolitů vykazovaly zajímavé vasorelaxační účinky 4-MC, 3,4-DHPA a také 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (3-HPPA). U těchto tří metabolitů byly sledovány i možné mechanismy účinku – část pokusů byla náplní mojí práce. Dále byl u těchto látek *ex vivo* zkoumán i vasorelaxační účinek na mezenterickou artérii (tyto pokusy zohledňují nesmírný význam drobných cév pro krevní tlak). Získané pozitivní výsledky byly následně potvrzeny i v experimentech *in vivo*. Všechny sledované látky (4-MC, 3,4-DHPA a 3-HPPA) byly schopny snížit krevní tlak u hypertenzních potkanů a tento účinek byl dávkově závislý. (Najmanová et al. 2016, Pourová et al. 2018)

8 ZÁVĚR

Rigorózní práce sledovala mechanismy vasorelaxačního účinku vybraných metabolitů kvercetinů na stěnu hrudní aorty potkana *ex vivo*. Zjistili jsme, že:

- Oba testované metabolity, 4-MC i 3,4-DHPA, skutečně vykazují vasorelaxační účinek.
- Při užití inhibitoru cyklooxygenázy (indomethacinu) byla potlačena vasorelaxační aktivita 3,4-DHPA, vasorelaxační účinek 4-MC se téměř nezměnil.
- Při užití inhibitoru IK_{Ca} (TRAM-34) došlo k potlačení vasorelaxační aktivity 3,4-DHPA, vasorelaxační účinek 4-MC byl naopak paradoxně výraznější.
- Při současném užití inhibitorů IK_{Ca} (TRAM-34) a SK_{Ca} (UCL-1684) došlo k významnému potlačení vasorelaxační aktivity 3,4-DHPA, u 4-MC byl pokles tohoto účinku nevýznamný.
- Z výsledků vyplývá, že na vasorelaxaci navozené 3,4-DHPA se podílejí jak cyklooxygenáza, tak i draslíkové kanály aktivované vápníkem.
- Mechanismus vasodilatačního účinku 4-MC nelze z výsledků odvodit, účast cyklooxygenázy je nepravděpodobná.

9 LITERATURA

KNIHY, JINÉ MONOGRAFIE A ČASOPISY

- 1) CHOLT M. Cévní sonografie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2013:57-9
- 2) ČERTÍK B. et al. Onemocnění karotid a velkých cév aortálního oblouku. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005:14-8
- 3) ČIHÁK R. Anatomie 3. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s r.o., 1997:69-117
- 4) ČÍŽEK V. Průvodce cévními chorobami. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2012:10-28
- 5) DOHNAL V., JEŽKOVÁ A., SKLÁDANKA J. Ergosterol: klíčový steroid hub. Kontakt 2008;2:449-53.
- 6) DOLEŽAL M. et al. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2013:146-52
- 7) KAISER R. et al. Chirurgie hlavových a periferních nervů s atlasem přístupů. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2016:8
- 8) KITTNAR O. et al. Lékařská fyziologie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011:113-20
- 9) KOPECKÝ M., CICHÁ M. Somatologie pro učitele. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2005:106-11
- 10) LANGMEIER M. et al. Základy lékařské fyziologie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009:83-301

- 11) LÜLLMANN H. et al. Farmakologie a toxikologie. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004:145-347
- 12) MOUREK J. Fyziologie – učebnice pro studenty zdravotnických oborů. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005:40-4
- 13) NAGY M., MUČAJI P., GRANČAI D. Farmakognózia. 2. vyd. Bratislava: Herba, spol. s r.o., 2017:31-3
- 14) OPLETAL L. Přírodní látky a jejich biologická aktivita. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2016:430-97
- 15) POTUŽÁK M. Úprava hladiny cholesterolu rostlinnými prostředky. Praktické lékařství 2010;1:43-5
- 16) ROKYTA R. et al. Fyziologie. 3. vyd. Praha: Galén, 2016:35-125
- 17) RUTAR P. Pestrý účinek přírodních flavonoidů. Medicína pro praxi 2018; 2:85-6
- 18) SABOL F., KOLESÁR A., ARTEMIOU P. Ochorenia aorty. 1. vyd. Bratislava: VEDA, 2015:12-20
- 19) SAVELJEV I. Velká kniha léčitelství. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2014:128
- 20) SLONKOVÁ V. Nová klasifikace venoaktivních léků. Praktické lékařství 2017;2:63-6

- 21) SPENCER J. P. E., CROZIER A. Flavonoids and Related Compounds. 1. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2012;203-4
- 22) SPILKOVÁ J. et al. Farmakognozie. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2016:102-18
- 23) ŠRÁMEK J. et al. Chirurgická léčba degenerativního postižení bederní páteře. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2015:27
- 24) ŠTEJFA M. et al. Kardiologie. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007: 38.
- 25) ŠVIHOVEC J. et al. Farmakologie. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2018:356-70.
- 26) TROJAN S. et al. Lékařská fyziologie. 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 1994:37-267
- 27) VLČEK J., FIALOVÁ D. et al. Klinická farmacie I. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010:73-172
- 28) WARD J., CLARKE R., LINDEN R. Physiology at a Glance. 1. vyd. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2005:33-49

ELEKTRONICKÉ DOKUMENTY

- 1) ABDULKAREEM Z. A., GEE J. M. W., COX C. D., WANN K. T. Knockdown of the small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels is potently cytotoxic in breast cancer cell lines. In: *British Journal of Pharmacology* 2015. Dostupné na URL: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.13357>. Přístup: 25. 4. 2019

- 2) AGARWAL J. J., ZHU Y., ZHANG Q-Y., MONGIN A. A., HOUGH L. B. TRAM-34, a Putatively Selective Blocker of Intermediate-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels, Inhibits Cytochrome P450 Activity. In: *Plos One* 2013. Dostupné na URL: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063028>. Přístup: 25. 4. 2019

- 3) ANDRES S., PEVNY S., ZIEGENHAGEN R., BAKHIYA N., SCHÄFER B., HIRSCH-ERNST K.I., LAMPEN A. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. In: *Molecular Nutrition & Food Research* 2018. Dostupné na URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mnfr.201700447>. Přístup: 20. 12. 2019

- 4) ANONYM. Branches of the Aorta Abdominalis: Overview and Paired Branches. In: *Basicmedical Key* 2017. Dostupné na URL: <https://basicmedicalkey.com/overview-of-neurovascular-structures-2/>. Přístup: 6. 2. 2019

- 5) BERGER L. M., BLANK R., ZORN F., WEIN S., METGES C. C., WOLFFRAM S. Ruminal degradation of quercetin and its influence on fermentation in ruminants. In: *Journal of Dairy Science* 2015. Dostupné na URL: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(15\)00425-7/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00425-7/fulltext). Přístup: 20.08.2019

- 6) CARRASCO-POZO C., GOTTELAND M., CASTILLO R.L., CHEN CH. 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic β -cells dysfunction induced by high cholesterol. In: *Elsevier* 2015. Dostupné na URL: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/132396/34-dihydroxyphenylacetic-acid-a-microbiota-derived.pdf?sequence=1>.
Přístup: 04.09.2019
- 7) CASSIDY A., MINIHAINE A.- M. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. In: *American Journal of Clinical Nutrition* 2017. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5183723/pdf/ajcn136051.pdf>.
Přístup: 24. 11. 2019
- 8) ČERNOHORSKÁ J. Synergický účinek flavonoidů – cesta k léčbě žilního onemocnění. In: *Medicína po promoci* 2018. Dostupné na URL: <https://www.tribune.cz/clanek/43216-synergicky-ucinek-flavonoidu-cesta-k-lecbe-zilniho-onemocneni>. Přístup: 18. 12. 2019
- 9) DOUGLAS W. W., NASH P., BUTTAR H. S., GRIFFITHS K., SINGH R., DE MEESTER F., HORIUCHI R., TAKAHASHI T. The Role of Food Antioxidants, Benefits of Functional Foods, and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person: An Overview. In: *Antioxidants* 2017. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5745491/pdf/antioxidants-06-00081.pdf>. Přístup: 7. 6. 2019
- 10) DUNN P. M. UCL 1684: a potent blocker of Ca^{2+} -activated K^+ channels in rat adrenal chromaffin cells in culture. In *European Journal of Pharmacology* 1999. Dostupné na URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299999000291>.
Přístup: 25. 4. 2019

- 11) GALINDO P., GONZÁLEZ-MANZANO S., ZARZUELO M. J., GÓMEZ-GUZMÁN M., QUINTELA A. M., GONZÁLEZ-PARAMÁS A., SANTOS-BUELGA C., PÉREZ-VIZCAÍNO F., DUARTE J., JIMÉNEZ R. Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats. In: *Food & Function* 2012. Dostupné na URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2012/fo/c2fo10268d>. Přístup: 01.12.2019
- 12) JIANG TH., HUANG ZG. Effects of TRAM-34 on Proliferation and Invasion of Leukemia Cell Line HL-60. In: *China / Asia On Demand* 2017. Dostupné na URL: https://caod.oriprobe.com/articles/51691727/Effects_of_TRAM_34_on_Proliferation_and_Invasion_of_Leukemia_Cell_Line.htm. Přístup: 25. 4. 2019
- 13) KARATUG KACAR A., GEZGINCI-OKTAYOGLU S., BOLKENT S. 4-Methylcatechol stimulates apoptosis and reduces insulin secretion by decreasing betacellulin and inhibin beta-A in INS-1 beta-cells. In: *Human & Experimental Toxicology* 2018. Dostupné na URL: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0960327118758365?journalCode=hetb&>. Přístup: 19.09.2019
- 14) LEDOUX J., WERNER M. E., BRAYDEN J. E., NELSON M. T. Calcium – Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. In: *Physiology* 2006. Dostupné na URL: <https://www.physiology.org/doi/full/10.1152/physiol.00040.2005>. Přístup: 25. 4. 2019
- 15) LI C. J., JIANG Y. W., CHEN S. X., LI H. J., CHEN L., LIU Y. T., GAO S., ZHAO Y., ZHU X. L., WANG H. T., ZHENG L., ZHOU X. 4-Methylcatechol inhibits cell growth and testosterone production in TM3 Leyding cells by reducing mitochondrial activity. In: *Andrologia* 2017. Dostupné na URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/and.12581>. Přístup: 30.09.2019

- 16) LOPEZ E.O., JAN A. Cardiovascular disease. In: *NCBI Bookshelf* 2019. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/?report=printable>. Přístup: 20.11.2019
- 17) MAHMOUD A.M., BAUTISTA R.J.H., SANDHU M.A., HUSSEIN O.E. Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019. Dostupné na URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/5484138/>. Přístup: 12. 5. 2019
- 18) MARUNAKA Y., MARUNAKA R., SUN H., YAMAMOTO T., KANAMURA N., INUI T., TARUNO A. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. In: *Molecules* 2017. Dostupné na URL: http://scholar.google.cz/scholar_url?url=https://www.mdpi.com/1420-3049/22/2/209/pdf&hl=cs&sa=X&scisig=AAGBfm1d-6jyubOjCiKvUI5oiKoJziEWNA&nossl=1&oi=scholar. Přístup: 01. 10. 2019
- 19) MILLAR C.L., DUCLOS Q., BLESSO C.N. Effects of Dietary Flavonoids on Reverse Cholesterol Transport, HDL Metabolism, and HDL Function. In: *Advances in Nutrition* 2017. Dostupné na URL: <https://academic.oup.com/advances/article/8/2/226/4558130>. Přístup: 14. 6. 2019
- 20) NAJMANOVÁ I., POUROVÁ J., VOPRŠALOVÁ M., PILAŘOVÁ V., SEMECKÝ V., NOVÁKOVÁ L., MLADĚNKA P. The flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat. In: *Molecular Nutrition & Food Research* 2016. Dostupné na URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mnfr.201500761>. Přístup: 03.12.2019

- 21) POUROVÁ J., NAJMANOVÁ I., VOPRŠALOVÁ M., MIGKOS T., PILAŘOVÁ V., APPLOVÁ L., NOVÁKOVÁ L., MLADĚNKA P. Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries *ex vivo* and decrease blood pressure *in vivo*. In: *Vascular Pharmacology* 2018. Dostupné na URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1537189118301241?token=91B9B2D2B5F8FAB6B6910D843A94D76B4FE6EC56F2D0B3992A73BF7C6EDBCC090FB4A1A177AA847AA102FF7C2654C276>. Přístup: 01.12.2019
- 22) SCHILLING T., EDER C. TRAM-34 inhibits nonselective cation channels. In: *European Journal of Physiology* 2007. Dostupné na URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-007-0232-4>. Přístup: 25. 4. 2019
- 23) SKRBEK S., RÜFER C., MARKO D., ESSELEN M. Quercetin and its microbial degradation product 3,4-dihydroxyphenylacetic acid generate hydrogen peroxide modulating their stability under in vitro conditions. In: *Journal of Food and Nutrition Research* 2009. Dostupné na URL: http://scholar.google.cz/scholar_url?url=http://www.vup.sk/en/download.php%3FbuIID%3D106&hl=cs&sa=X&scisig=AAGBfm1n7pL1b6oIMfzYAcpVNIQHD01-QA&nossl=1&oi=scholarr. Přístup: 29.08.2019
- 24) SCHELIN R.R. Metabolism of Phenolic Acids by Rat Intestinal Microflora. In: *Acta pharmacologica* 1967. Dostupné na URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1600-0773.1968.tb00437.x>. Přístup: 09.09.2019
- 25) SPENCER J.P.E., KUHNLE G.G.C., WILLIAMS R.J., RICE-EVANS C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. In: *Biochemical Society* 2003. Dostupné na URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1223367/pdf/12578560.pdf>. Přístup: 29. 7. 2019

- 26) VISKUPIČOVÁ J., ONDREJOVIČ M., ŠTURDÍK E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. In: *Journal of Food and Nutrition Research* 2008. Dostupné na URL: https://www.researchgate.net/profile/Jana_Viskupicova2/publication/260529912_Bioavailability_and_metabolism_of_flavonoids/links/0c96053181e51e735f000000/Bioavailability-and-metabolism-of-flavonoids.pdf. Přístup: 12. 7. 2019
- 27) WULFF H. et al. Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel, IKCa1: A potential immunosuppressant. In: *PNAS* 2000. Dostupné na URL: <https://www.pnas.org/content/97/14/8151>. Přístup: 24. 4. 2019
- 28) YU-LIN H., WHEI-MIN L., JUNE-HORNG L., MING-FONG CH., SUNG-TSANG H. Effects of 4-Methylcatechol on Skin Reinnervation: Promotion of Cutaneous Nerve Regeneration After Crush Injury. In: *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 2009. Dostupné na URL: <https://academic.oup.com/jnen/article/68/12/1269/2609969>. Přístup: 24.09.2019
- 29) WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases (CVDs). In: *World Health Organization* 2017. Dostupné na URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)). Přístup: 12.11.2019
- 30) ZAMRAZIL V. Neuroendokrinní tumory. In: *Interní medicína pro praxi* 2007. Dostupné na URL: <https://www.solen.cz/pdfs/int/2007/11/08.pdf>. Přístup: 19.09.2019