

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



VASODILATAČNÍ ÚČINKY BISFENOLU AF *EX VIVO*

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2021

Nela Kuchařová

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

V Hradci Králové dne

Podpis

Ráda bych poděkovala své školitelce PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této práce. Mé poděkování patří také ostatním členům výzkumné skupiny Kardiiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie, kteří se podíleli na provedení experimentální části této diplomové práce. V poslední řadě děkuji své rodině, přátelům a partnerovi Petrovi za podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Nela Kuchařová

Školitel: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vasodilatační účinky bisfenolu AF *ex vivo*

Bisfenoly jsou organické sloučeniny využívané k výrobě plastů, pryskyřic, obalů, laků a další řadě produktů. Nicméně jejich působení v organismu je spojováno s množstvím nevhodných účinků, které je třeba detailněji zkoumat.

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda bisfenol AF vykazuje vasodilatační účinky metodou *ex vivo* a ověřit mechanismus relaxačního účinku. Experimenty byly prováděny na izolované hrudní aortě potkana kmene Wistar. K prekontrahované aortě byl kumulativně přidáván bisfenol AF ve vzrůstající koncentraci a sledovali jsme, zda došlo k navození vasodilatace. Při testování mechanismu účinku jsme během pokusu použili inhibitory jednotlivých zkoušených mechanismů. Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism.

Z výsledků vyplývá, že bisfenol AF má vasodilatační účinek *ex vivo*, který je závislý na podané dávce ($EC_{50} = 57,16 \mu\text{M}$). Mechanismem tohoto účinku je zablokování napětově řízených vápenatých kanálů na buňce hladkého cévního svalů. Účast ostatních testovaných mechanismů účinku nebyla prokázána.

Klíčová slova: bisfenol AF, potkan, aorta, vasodilatace, *ex vivo*

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Nela Kuchařová

Supervisor: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Vasodilatory effects of bisphenol AF *ex vivo*

Bisphenols are organic compounds used in the manufacture of plastics, resins, varnishes and lot of other products. However, their effects on human body are associated with a number of adverse effect that need to be investigated in more detail.

The aim of this diploma thesis was to determine whether bisphenol AF has vasodilating effects *ex vivo* and to verify the mechanism of the relaxing effect. The experiments were performed on an isolated thoracic aorta of a Wistar rat. Bisphenol AF was added cumulatively to the precontracted aorta at increasing concentrations and we monitored whether vasodilation was induced. In testing the mechanism of action, we used inhibitors of the mechanisms tested during the experiment. The obtained results were evaluated using the GraphPad Prism program.

The results show that bisphenol AF has a dose-dependent *ex vivo* vasodilatory effect ($EC_{50} = 57.16 \mu\text{M}$). The mechanism of this effect is the blockage of voltagegated calcium channels on the vascular smooth muscle cell. The participation of other tested mechanisms has not been confirmed.

Key words: bisphenol AF, rat, aorta, vasodilation, *ex vivo*

Obsah

1. Seznam zkratek	8
2. Úvod.....	11
3. Teoretická část	12
3.1. Kardiovaskulární systém.....	12
3.1.1. Srdce	12
3.1.2. Cévní systém.....	12
3.1.3. Histologie cév	13
3.1.4. Rozdělení cév.....	14
3.1.5. Vaskularizace a inervace cév	17
3.1.6. Endotel.....	17
3.1.7. Hladká svalovina.....	18
3.2. Regulace vasokonstrikce a vasodilatace	21
3.2.1. Endotelová regulace.....	21
3.2.2. Hormonálně-neurogenní regulace.....	26
3.2.3. Enzymatická regulace	32
3.3. Bisfenoly	34
3.3.1. Účinky v organismu.....	37
3.3.2. Kardiovaskulární účinky.....	38
4. Cíl práce	39
5. Experimentální část.....	40
5.1. Pokusná zvířata a materiální vybavení	40
5.1.1. Pokusná zvířata	40
5.1.2. Chemikálie a látky	40
5.1.3. Přístrojové vybavení a pomůcky.....	42
5.2. Metodika práce	42
5.2.1. Příprava	42

5.2.2. Vlastní experiment	43
5.2.3. Vyhodnocení	45
6. Výsledky.....	46
7. Diskuze.....	49
8. Závěr.....	52
9. Literatura	53

1. Seznam zkratek

5-HT	Serotonin = 5-hydroxytryptamin
5-LO	5-lipoxygenáza
A	Adrenalin
AA	Arachidonová kyselina
AC	Adenylátcykláza
ACE	Angiotenzin-konvertující enzym
ACH	Acetylcholin
ACHE	Acetylcholinesteráza
ACTH	Adrenokortikotropní hormon
ADH	Antidiuretický hormon = vasopresin
ADP	Adenosindifosfát
AMK	Aminokyselina
ANP	Atriální natriuretický peptid
AT _{II}	Angiotenzin II
ATP	Adenosintrifosfát
ATPáza	Adenosintrifosfatáza
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BNP	Mozkový natriuretický peptid
BPA	Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CAT	Cholinacetyltransferáza
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát

CNP	C natriuretický peptid
CNS	Centrální nervová soustava
COX	Cyklooxygenáza
CO ₂	Oxid uhličitý
COMT	Katechol-O-methyltransferáza
DAG	Diacylglycerol
ECE	Endotelin konvertující enzym
EDRF	Endotel dependentní relaxační faktor
ECHA	Evropská chemická agentura
eNOS	Endoteliální oxid dusnatý syntáza
ET-1	Endotelin-1
FAD	Flavinadenindinukleotid
GC	Guanylátcykláza
GTP	Guanosintrifosfát
IP ₃	Inositoltrifosfát
MAO	Monoaminoxidáza
MLCK	Lehkořetězcová myosin kináza
MLCP	Lehkořetězcová myosin fosfatáza
NA	Noradrenalin
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NHANES	Národní průzkum zdraví a výživy
NO	Oxid dusnatý
NP	Natriuretický peptid
O ₂	Kyslík

PIP ₂	Fosfoinositoldifosfát
PLA ₂ /PLC	Fosfolipáza A ₂ / C
PGG ₂ /PGH ₂ /PGE ₂ /PGI ₂	Prostaglandin G ₂ /H ₂ /E ₂ /I ₂
PKA/PKC/PKG	Proteinkináza A/C/G
RAAS	Renin-angiotenzin-aldosteron systém
RHO-A	Malá GTPáza RhoA
ROCK	Rho-asociovaná protein kináza
ROS	Reaktivní forma kyslíku
SR	Sarkoplazmatické retikulum
TxA ₂	Tromboxan A ₂
UIPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
VCAM-1	Vaskulární buněčný adhezní protein 1
VNS	Vegetativní nervový systém

2. Úvod

Kardiovaskulární soustava je důležitý transportní systém zabezpečující základní životní funkce. Skládá se ze srdce a cév. Jako celek se podílí na okysličování tkání, zajištění živin a transportu exogenních i endogenních látek, ale také na odvodu odpadních produktů metabolismu. Regulace kardiovaskulárního systému probíhá na dvou úrovních – lokální a centrální. Hlavním orgánem regulace je hladká svalovina. Ta je přítomna v cévách a dutých orgánech. K vasodilataci nebo vasokonstrikci dochází působením látek typu hormonů, neuromediátorů nebo endoteliálních působků na buňky hladké svaloviny.

V České republice se kardiovaskulární onemocnění na celkové mortalitě podílejí z více než 54 % (Klener et al. 2012: 175). Mezi nejčastější choroby patří hypertenze. V roce 2012 trpělo hypertenzí 40 % obyvatelstva, přičemž prevalence onemocnění stále stoupá (Widimský 2017). Dále sem patří ischemická choroba srdeční, arytmie, srdeční selhání, cévní mozková příhoda a jiné. Neovlivitelným faktorem pro jejich rozvoj je věk, pohlaví či genetická anamnéza. Mezi ovlivnitelné faktory patří obezita, kouření, porucha lipidového spektra, diabetes mellitus a další skutečnosti pramenící z nezdravého životního stylu.

Na člověka významně působí prostředí, ve kterém se nachází. Proto expozice látkám z okolí může s sebou nést akutní i dlouhodobé důsledky. Mezi tyto látky se řadí i bisfenoly. Bisfenoly jsou spojovány s negativními účinky na organismus, ale podrobné informace mnohdy chybí, a to včetně možného působení na kardiovaskulární systém. Cílem této diplomové práce je rozšířit naše poznatky o kardiovaskulárních účincích bisfenolů. Práce je členěna do dvou hlavních částí. První část práce se pokouší shrnout a objasnit teoretické poznatky fungování kardiovaskulárního systému, přičemž se zaměřuje zejména na regulační mechanismy. Jejich pochopení je důležité pro následnou experimentální část. Jejím cílem je otestovat vasodilatační aktivitu bisfenolu AF a ověřit mechanismus jeho účinku. Experimenty byly realizovány v laboratoři katedry farmakologie a toxikologie na Farmaceutické fakultě UK v Hradci Králové za použití metody *ex vivo* na izolované hrudní aortě potkana.

3. Teoretická část

3.1. Kardiovaskulární systém

Kardiovaskulární systém je složený ze srdce a cév, které tvoří dva celky – systémové a plicní řečiště. Plicní oběh zajišťuje potřebou oxygenaci krve. Systémové řečiště zabezpečuje okysličení a přísun potřebných živin do tkáně a současně odvod zplodin metabolismu včetně oxidu uhličitého (CO₂). Oba systémy jsou poháněny jednou pumpou, srdcem. Díky němu celým organismem neustále proudí krev. Ta po vypuzení ze srdce koluje tepnami do kapilár, což jsou jediné cévy zajišťující látkovou výměnu mezi krví a tkání. Z nich krev proudí žilami zpět do srdce (Rokyta 2015: 123).

3.1.1. Srdce

Srdce je dutý orgán umístěný za hrudní kostí, větší částí vlevo od středové čáry. Jeho tvar lze popsat jako obrácený kužel, jehož hrot je nasměrován dopředu a doleva, se základnou přivrácenou dozadu do dutiny hrudní. Prostor, ve kterém je srdce uloženo, se nazývá mediastinum. Kryto je obalem zvaným perikard neboli osrdečník. Srdce je orgán svalový, přesněji je tvořen příčně pruhovanou srdeční svalovinou zvanou myokard. Tato svalovina je z vnější strany kryta epikardem. Z vnitřní strany, tedy uvnitř srdce, je pokryta blánou nazývanou endokard (Čihák 1997: 8–25). Srdeční pumpu tvoří pravá a levá část, každá je složená ze síně a komory. Síně jsou od komor odděleny cípatými chlopněmi. Vpravo se nachází chlopeň trojcípá, vlevo dvojcípá, též známá jako mitrální. Chlopně poloměsíčité usměřňují tok krve na výstupu z komory do plicního nebo systémového řečiště. Pro zajištění krevního oběhu se srdeční komory rytmicky stahují (provádí systolu) a ochabují (provádí diastolu). *Pravá i levá část srdce přečerpává krev z žil jednoho řečiště do tepen řečiště druhého* (Rokyta 2015: 123–124). Přesněji tedy se komory během diastoly naplní krví. Ta se do komor dostává ze síní, kam přitéká z horní a dolní duté žíly v případě pravého srdce a z plicních žil v případě levého srdce. V momentě systoly pravá komora vypudí krev do plicnice, levá do aorty (Langmeier 2009: 56).

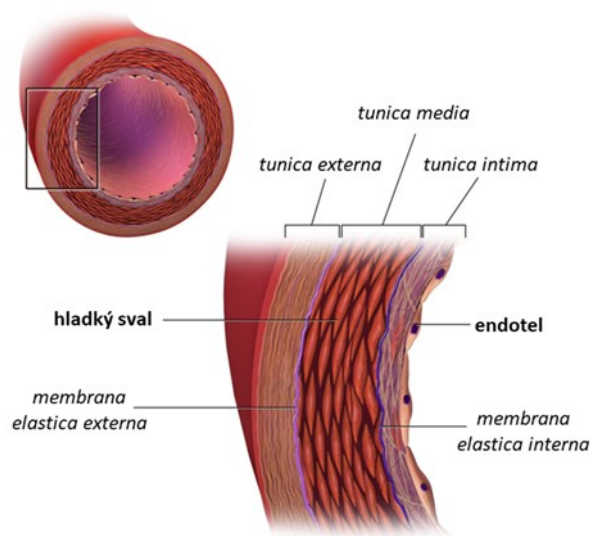
3.1.2. Cévní systém

Cévní systém je uzavřená soustava trubic a trubiček, které se v různých úsecích lidského těla odlišují svou stavbou. S tím úzce souvisí propustnost cévních stěn a celkové vlastnosti cévy (Dylevský 2009: 394). Cévní řečiště tvoří tepny (artérie) a žíly (vény).

Z větších tepen a žil se rozebíhají a větví arterioly a venuly. Propojení mezi nimi zajišťují kapiláry. Kromě transportní funkce se cévní soustava vyznačuje regulační a ochrannou funkcí a podílí se na stálosti vnitřního prostředí – homeostáze (Trojan et al. 2003: 56, 179–189).

3.1.3. Histologie cév

Samotná cévní stěna se skládá ze třech vrstev: *tunica intima*, *tunica media*, *tunica externa*. Zastoupení vrstev ve stěně se liší dle konkrétního typu cévy. Toto uspořádání závisí na okolních faktorech, kterým jsou cévy vystaveny (Trojan et al. 2003: 184–186). Jednotlivé vrstvy na průřezu cévní stěnou znázorňuje obr. 1.



Obr. 1: Stavba cévní stěny. Převzato z: en.wikipedia.org, Blausen.com staff 2014

3.1.3.1. *Tunica intima*

Tunica intima je tvořena dvěma vrstvami. Endotelová vrstva vystýlá celý vnitřní povrch cévy. Buňka endotelu je plochá, zpravidla protažená ve směru krevního oběhu. Jádro se nachází v centrální oblasti buňky. Uvnitř se nachází také mikrofilamenta a filamenta, jejichž přítomnost umožňuje mírnou kontrakci. Je to dlouho-žijící element s malou mitotickou aktivitou (Vajner et al. 2015: 6–7). Tvoří polopropustnou membránu mezi krví a tkáňovou tekutinou. Základní vlastností endotelu je tvorba různých působků jako reakce na mechanickou zátěž, natahování či jakékoliv napětí v cévě. Dokáže tak regulovat průtok krve. Vykazuje tedy rozsáhlou metabolickou aktivitu. Mimo to má také antitrombogenní efekt či produkuje růstové faktory. Endotel je velmi komplikovaný orgán a jeho hmotnost v celém těle je asi 1,5 kg. Jakékoliv jeho narušení a poškození vede ke vzniku trombů, kardiovaskulárním komplikacím a chorobám. Subendotelovou vrstvu

tvoří řídké kolagenní vazivo a v malé míře i jednotlivé buňky hladkého svalu (Dylevský 2009: 394, Mescher 2018: 221–223).

3.1.3.2. *Tunica media*

Tunica media je nejobjemnější vrstvou cévní stěny, respektive hlavně tepen. Je tvořena spirálovitě uspořádanými buňkami hladkého svalu. V mezibuněčné hmotě, kterou produkují, se nachází glykosaminoglykan, chondroitin sulfát a proteoglykan. Dále obsahuje elastická a retikulární vlákna. Elastická vlákna tvoří síť a blanky s otvory, a tím umožňují prostupu živin do dalších částí cévní stěny. Těmto otvorům se říká *membranae fenestrae*. Někdy se tyto elastické útvary nachází na rozhraní s *tunica intima* a *tunica externa*, čímž dochází ke vzniku membrán (Vajner et al. 2015: 6–7). Přítomnost hladké svaloviny umožňuje regulaci průsvitu cév, a tedy usměrňuje průtok krve a krevní tlak (Dylevský 2009: 394). Dle velikosti tepny je ovlivněn poměr mezi svalovou a elastickou částí *tunica media*. U větších tepen převládá elastická složka. Středně velké tepny mají složky vyvážené. U malých tepen již přibývá svalové části, přičemž nejmenší tepénky bývají až čistě svalového charakteru. Žilní *tunica media* je svalovinou tvořena méně, v některých žilách zcela chybí (Čihák 1997: 69–76).

3.1.3.3. *Tunica externa*

Vnější vrstvu tvoří *adventicie* a elastická membrána oddělující tuto vrstvu od *tunica media*. *Adventicie* je vazivo tvořené sítí proplétajících se elastických a kolagenních vláken, což je výhodné pro mechanické vlastnosti cévy. Tato vlákna přecházejí až do vnějšího okolí. Zajišťují tak pružnou fixaci cévy v prostoru (Trojan et al. 2003: 184).

3.1.4. Rozdělení cév

Cévy se rozdělují na lymfatické a krevní. Jak již bylo výše zmíněno, krevní cévy se dělí na artérie, vény a kapiláry. V systémovém řečišti artérie odvádí okysličenou krev ze srdce. Postupně se v řečišti větví a zmenšují. Přecházejí v kapiláry, kde dochází k výměně plynů a dostatečné dodávce kyslíku (O₂) buňkám. Kapiláry se dále rozšiřují ve vény, které se starají o dopravení odkysličené krve zpět do srdce. V plicním řečišti je tomu pak obráceně, tj. artérie nesou neokysličenou a vény okysličenou krev (Mescher 2018: 218, Naňka a Elišková 2015: 85–87).

3.1.4.1. Artérie elastického typu

Tepnou elastického typu se rozumí taková tepna, jejíž stěnu tvoří z velké části elastické vazivo navrstvené do několika membrán. Průměr tepny bývá zpravidla více než 10 mm. *Tunica media* je mohutná, protkaná svalovými buňkami. Dobře vyvinutá je také *tunica intima*. Zde se řadí velké tepny včetně těch největších – aorty, plicnice a jejich větví. Elastická artérie se skládá až z 50 vrstev elastických membrán. Vysoká pružnost a roztažnost zabezpečuje rychlý a neustálý tok krve ze srdce do periferních oblastí. Během kontrakce srdce se tepna může dostatečně napsnout díky elastinu. V momentě diastoly se elastin opět vrátí do původního stavu a tím udrží arteriální tlak. Rychlost proudění a arteriální tlak klesá v závislosti na vzdálenosti cévy od srdce (Mescher 2018: 223–226, Naňka a Elišková 2015: 85–87).

3.1.4.2. Artérie svalového typu

Stěna této cévy je tvořena hlavně svalovou hmotou. *Tunica media* obsahuje až 40 vrstev svaloviny, které jsou protkány elastickými blankami, a to v závislosti na velikosti tepny. Jedná se o tepny orgánů včetně koronárních artérií. Pomocí kontrakce a relaxace mají tepny schopnost regulovat přísun krve do orgánů. Čím více se vzdalují srdci a vedou do periferie, zužuje se jejich průměr. Obecně platí, že průměr svalové arterie začíná na 10 mm a zužuje se až do průměru 10 μm . Pro tak malé tepny, složené ze 3–4 vrstev svaloviny, se dále užívá název arterioly. V případě, že se jedná o přechod artérie v kapiláru, užívá se název terminální arterioly. V rámci jednoho orgánu či sousedních orgánů může dojít k příčnému nebo šikmému propojení – anastomóze. Na konci arterioly se nachází svalové buňky s povahou svěrače (prekapilární *sfinkter*), a tím dojde k regulaci krevního zásobení kapilár. Dochází k odolávání vůči toku krve, a proto jsou tyto cévy důležitým faktorem udávající krevní tlak. Někdy dochází také k anastomóze mezi artérií a vénou, přičemž krev zcela obejde kapilární řečiště (Mescher 2018: 226–229, Naňka a Elišková 2015: 85–87).

3.1.4.3. Vény

Žíly v porovnání s tepnami vykazují značné odlišnosti ve stavbě stěny. Nejsilnější vrstvou žil je *tunica adventicia*, čímž se liší od tepen, kde je nejvíce zastoupena *tunica media*. Mimo to na vnitřní straně stěn se vyskytují duplikatury *intimy* – chlopně (Martínek a Vacek 2009: 12). Ty usnadňují hladší tok krve zpět do srdce, a to proti gravitaci. Vyskytují se především v menších a středních vénách. Nicméně tok krve je usměrňován také kontrakcí kosterní svaloviny v okolí vény. Postkapilární venuly mají průsvit 15–20

μm a tvoří je fenestrováný endotel, na který adherují bílé krvinky. Těmito otvory opouští cirkulaci do místa infekce nebo poškození. Rozšiřováním průměru vznikají venuly a vény. Ty už mají zastoupení všech třech vrstev cévní stěny. Malé a střední vény mají průměr pod 10 mm. Ve své *tunica media* mají již malé svazky hladkosvalových buněk a vazivo. *Adventicie* je tvořena mimo longitudinální vlákna kolagenu také buňkami hladké svaloviny. Velké vény, tvořící kmeny poblíž srdce, mají vrstvy stěn nejsilnější. *Adventicie* je již prostoupena svazky hladké svaloviny. Ta zabezpečuje zpevnění stěny a brání její distenzi (Mescher 2018: 232–234, Naňka a Elišková 2015: 85–87, Vajner et al. 2015: 11–12).

3.1.4.4. Kapiláry

Kapiláry neboli vlasečnice jsou velmi úzké cévy o průměru kolem 7 μm , jejichž stěnu tvoří jenom jedna vrstva endotelových buněk, k nimž zvenčí přiléhá síť retikulárních vláken (Čihák 1997: 71). V sítnici oka a ve svalech jsou kapiláry nejtenčí (5–7 μm). Naopak nejširší kapiláry se nachází v játrech, zubní a kostní dřeni či kůře nadledvin (12–15 μm). Jejich uspořádání se liší dle jednotlivých orgánů, například seskupení klubička v ledvinách. Tenkou stěnou endotelu probíhá celková látková výměna včetně výměny O_2 a CO_2 . Tok krve kapilárou je velmi pomalý proces. To je dáno průsvitem kapiláry, který je úměrný velikosti erytrocytu. Průsvit se dokáže měnit různými působky, jako je konstriční adrenalin a dilatační histamin. Podél kapilár se vyskytují jednotlivé buňky, které obklopují endotel. Tyto buňky se nazývají pericyty a vytváří pomyslnou bazální laminu. Přítomnost proteinů aktinu, myosinu a tropomyosinu zajišťuje lehkou kontrakci pericytů. Kromě pericytů se v okolí dále nacházejí kolagenní vlákna. Podle struktury endotelové buňky se vydělují 4 skupiny: kapiláry se souvislou endotelovou výstelkou, fenestrované, sinusoidní a kapiláry s póry (Čihák 1997: 69–76, Naňka a Elišková 2015: 85–87, Vajner et al. 2015: 8–10).

3.1.4.5. Mízní systém

Vedle krevního řečiště se v těle nachází lymfatický systém složený z lymfatických kapilár, cév, kmenů a uzlin. Míza (lymf) se podobá krevní plazmě. Obsahuje bílé krvinky a proteiny. Její základní funkcí je transport bílkovin, tuků a nadměrného množství tekutin. Tento systém je tedy důležitý pro udržování vyváženého poměru tekutin v tkáních a krvi (Dylevský 2009: 413–416). Lymfatické kapiláry jsou slepě začínající cévy, jejichž stěnu tvoří endotel s mezerami, jimiž prostupuje tkáňová tekutina. Upevněny jsou přiléhajícími kolagenními vlákny. Spojováním kapilár vznikají mízní cévy, jejichž stavba odpovídá

stavbě žilní stěny, a to včetně chlopní. Pomocí nich a hladké svaloviny dochází k posunu lymfy přes mízní kmeny do žilního řečiště. Současně je zabráněno zpětnému toku. Lymfatické uzliny jsou koordinovaně rozestě útvary, kterými je filtrována protékající lymfa. Na rozdíl od krevního oběhu je tedy lymfatický oběh otevřený (Mescher 2018: 235–237, Fontana et al. 2014).

3.1.5. Vaskularizace a inervace cév

V případě větších tepen jsou stěny silnější a nedostává se jim dostatek kyslíku a živin z protékající krve. Proto je jejich stěna prostoupena tepénkami a žilkami vyživující také *adventicii* a vnější polovinu *tunica media*. Označují se jako *vasa vasorum*. Vznikají rozvětvením artérie, kterou současně i vyživují nebo rozvětvením vedlejší cévy. V žilních stěnách prostupují až do *tunica intima* a objevují se díky většímu deficitu kyslíku častěji (Číhák 1997: 70–71).

Stěnami cév prostupují autonomní nemyelinizovaná nervová vlákna pro inervaci hladkého svalstva a vytváří hustou síť. Hlavním neuromediátorem je noradrenalin, jehož uvolnění navozuje vasokonstrikci (Vajner et al. 2015: 7–8). Působením acetylcholinu na muskarinové receptory dojde k uvolnění endoteliálního oxidu dusnatého (NO), jehož výsledkem je vasodilatace (Fontana et al. 2014).

3.1.6. Endotel

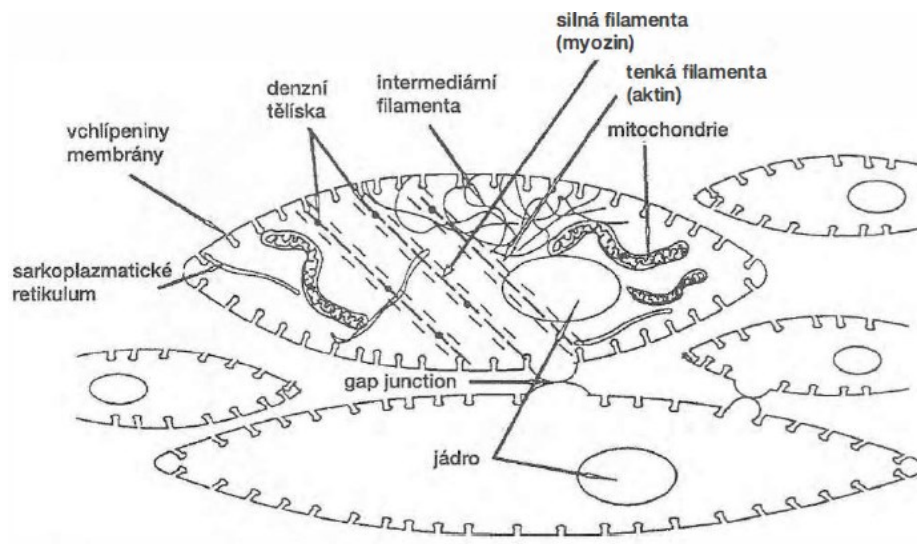
Všechny cévy jsou z vnitřní strany vystlány tímto endokrinním orgánem. Dle jednotlivých tělesných orgánů vykazuje endotel jedinečné vlastnosti, které umožňují jejich správnou funkci. S tím souvisí i zesílení či zeslabení jeho funkce v určitých oblastech. Syntézou látek reguluje hemokoagulaci, krevní tok, růst buněk či tvorbu extracelulární matrix. Dokáže usměrňovat vstup leukocytů do tkání pomocí adhezivních molekul, např. vaskulární buněčný adhezivní protein 1 (VCAM-1). Svým metabolismem udržuje rovnováhu kyslíkových radikálů a podporuje oxidaci plazmatického LDL (low density lipoprotein) cholesterolu. Permeabilita endotelu je ovlivněna kontrakcí prostřednictvím aktinu a myozinu. Buňka endotelu tvoří cíl pro mnohé regulační mechanismy. Když je taková buňka aktivována, dojde k akutní situaci a výkyvu běžné rovnováhy. Tu endotel dokáže opět obnovit, pokud vyvolávací impulz odezní. Pokud je však akce dlouhodobá, může dojít až k endoteliální dysfunkci a chronické poruše cév (Rokyta 2015: 158–160).

3.1.7. Hladká svalovina

Hladká svalovina tvoří stěny útrobu a s výjimkou kapilár i všech cév (Trojan et al. 2003: 104). Přítomna je tedy v dutých orgánech jako je děloha, žaludek, močový měchýř, střeva a v tepnách a žilách. Vyskytuje se také v očích, kde pracuje s duhovkou. Přítomností v pokožce dokáže reagovat např. na změnu teploty či emoce. Stavba hladké svaloviny je v porovnání s příčně pruhovanou svalovinou poměrně jednoduchá a její fungování není ovlivnitelné vůlí. Buňka myocyt je výrazně menší (šířka 2–5 μm , délka 50–500 μm), často jednojaderná, protáhlá a větvenovitá. Struktura buňky je podrobněji znázorněna na obr. 2. Povrchová membrána s množstvím receptorů tvoří vychlípeniny, v jejichž blízkosti se nachází sarkoplazmatické retikulum (SR). Uvnitř buňky, v cytoplazmě, jsou myofibrily. Ty se skládají z kontraktálních bílkovin – aktinu a myozinu. Na rozdíl od příčného pruhování kosterního svalu nevytváří úhledné sarkomery. Filamenta jsou volně rozmístěna a vytváří neuspořádanou síť (mřížku). Myofibrily jsou uloženy v paralelní rovině s delší, protaženou stranou buňky, což také odlišuje hladký sval od kosterního svalu. Liší se i celková molekulární stavba, a také mechanismus kontrakce. Probíhá sice na stejném principu interakce aktinu a myozinu, avšak hladký sval kontrakci vykonává pomaleji a má také delší trvání. Hladké svalstvo je ovládáno lokálními působky, látkami typu tkáňových hormonů a autonomními nervy, zejména sympatikem, ale nepřímo i parasympatikem. Kontrakce je navozena také po mechanickém podnětu a prostřednictvím tzv. pacemakerovým buňkám se dokáže kontrahovat izolovaně, jen v určitých oblastech svaloviny (Dylevský 2009: 61, Trojan et al. 2003: 104–109, Webb 2003).

Existují dva základní typy hladkého svalu, které mají v těle odlišná umístění i vlastnosti. Jednotkový hladký sval má svá vlákna spojena tzv. *gap junctions*, kdy pomocí depolarizace dochází k přenosu signálu z buňky na buňku. Dochází tak ke vzniku funkčního soubuní – syncitia. Jednotkový hladký sval se nachází ve vnitřních stěnách všech orgánů (bez srdce). Díky jeho roztažnosti a organizační variabilitě dokáže reagovat na stresovou situaci. Sval takového orgánu se napne, například při jeho naplnění, a kontrahuje. Aby nedošlo k vyprázdnění orgánu, přechází sval do relaxace. Kolem těchto orgánů zajišťuje hladký sval stále určitou míru napětí, aby naopak nedošlo k přílišnému ochabnutí. Tento útrobní sval tedy vykazuje určitou autonomii a jeho reakce nemusí nutně záviset na nervovém/humorálním stimulu (Betts et al. 2013: 432–436, Trojan et al. 2003: 104–109).

Vícejednotkový hladký sval nemá propojené buňky, a proto se kontrakce na vedlejší buňky nešíří a je omezena jen na původně stimulovanou buňku. Vyskytuje se hlavně v oblastech, kde je třeba jemného a cíleného pohybu, jako například v *musculus ciliaris*, v dýchacích cestách a velkých cévách. Některé jeho vlastnosti jsou podobné svalu kosternímu, není však ovlivnitelný vůlí a je velmi citlivý na určité hormony a mediátory (Betts et al. 2013: 435, Trojan et al. 2003: 105).

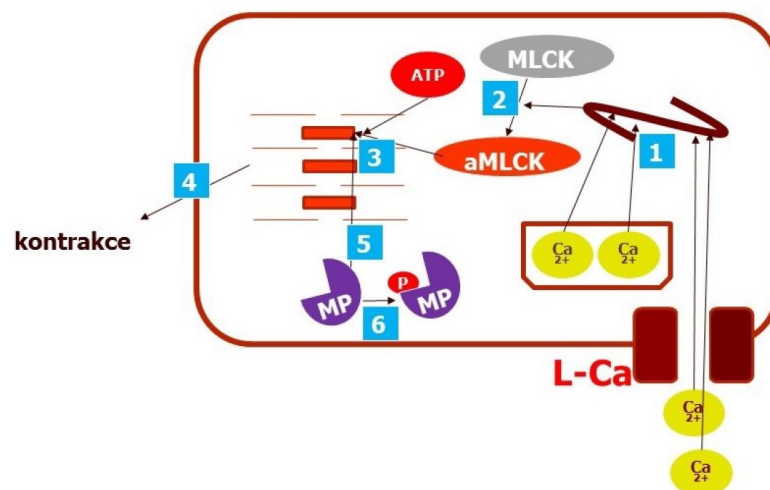


Obr. 2: Buňka hladké svaloviny. Převzato z: Trojan et al. 2003: 105

3.1.7.1. Kontrakce hladkého svalu

Základem kontrakce je uspořádání mezi bílkovinami aktin (tvořící lehká filamenta) a myozin (tvořící těžká filamenta). Lehká filamenta neobsahují troponin. Aktin je uchycen v denzních tělíscích, která jsou umístěna zcela nepravidelně v cytoplazmě a plazmatické membráně (sarkolemě). Na denzní tělíska se upínají i intermediární filamenta (desmin a vimentin) a tvoří síť v cytoskeletu. Spojení některých denzních tělísek jedné buňky s tělísky druhé buňky způsobí přenos síly a umožní kontrahovat jako celek. Buňky jsou spojeny také pomocí *gap junctions*. Za spuštění kontrakce je zodpovědný vápník. Dovnitř svalové buňky se dostává z extracelulární tekutiny pomocí napěťově a chemicky řízených iontových kanálů, zejména L typu vápníkových kanálů. Malá část vápníku se uvolní také ze sarkoplazmatického retikula. Uvnitř buňky se naváže na kalmodulin. Vytvoří tak komplex, který je schopen aktivovat kalmodulin-dependentní kinázu (lehkořetězcová myosinkináza – MLCK). Ta je potřebná pro fosforylaci hlavy lehkého řetězce myozinu. Takto aktivovaná myozinová adenosintrifosfatáza (ATPáza) dovolí myozinu přitahovat si vlákna aktinu, a tím navodit

svalovou kontrakci. Reakce probíhá za cyklické tvorby můstků mezi myozinem a aktinem. Zdrojem energie je adenosintrifosfát (ATP), který se štěpí na adenosindifosfát (ADP) a fosfát. Vlivem interfilament se reakce přenáší celým svalovým vláknem. V momentě, kdy dojde ke snížení koncentrace kalcia v buňce, aktivuje se enzym lehkoreťezcová myozin fosfatáza (MLCP). Defosforylací myozinu dochází k ukončení kontrakce a zaniká komplex kalmodulin-vápník. Celý proces vedoucí ke kontrakci znázorňuje obr. 3. Hladina vápníku v cytoplasmě se snižuje buď aktivním transportem (vliv Ca/Mg-ATPázy) zpět do sarkoplazmatického retikula a extracelulární tekutiny nebo antiportem se sodíkem přes plazmatickou membránu (Langmeier 2009: 299–301, Fontana et al. 2014, Webb 2003). *Pro udržení svalového tonu však v sarkoplasmě zůstává nízká koncentrace vápníku. Tento zbývající vápník udržuje sval mírně stažený, což je důležité v určitých systémech a kolem cév* (Betts et al. 2013: 434). Na výsledné odpovědi se v klidovém stavu podílejí vápníkové jiskry a vápníkové vlny, které naopak působí vasodilatačně (Cheng a Lederer 2008).



Obr. 3: Kontrakce hladkého svalu. Převzato z: Mladěnka 2018a

Kontrakci většinou předchází stimul, například nervový, jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole. Vlákná nervů, které inervují hladkou svalovinu, obsahují varikozity. Jsou to rozšířené útvary na axonech. Vypadají jako korálky a často se vyskytují v těsné blízkosti svalové buňky. V místě varikozit se uvolňují neuromediátory. Buňky inervuje sympatikus a uvolňuje svůj hlavní neuromediátor noradrenalin. Přímá parasympatická inervace zde není, ale cévy dokáže ovlivnit acetylcholin. Depolarizace plazmatické membrány svalové buňky na základě příslušného receptoru otevírá kalciové kanály a vede ke kontrakci. Ke kontrakci vedou také hormony obsažené v krevním řečišti.

Kromě adrenalinu a noradrenalinu působí vasokonstrikčně také angiotenzin, endotelin 1, antidiuretický hormon, oxytocin a serotonin. Naopak vasodilataci navodí histamin. Dochází k tomu v závislosti na receptorové výbavě prostřednictvím iontových kanálů a membránových receptorů spojených s G proteinem za pomoci druhých posílů a navození složité kaskády. V poslední řadě je možná reakce související se změnou okolí buněk. Stává se tak například u drobných cév, kdy při hypoxii, snížení pH tkáně či hyperkapnii dojde k vasodilataci. Naopak při hyperkalcemii reaguje sval kontrakcí. Cévy reagují také na fyzikální podněty jako je změna teploty a natažení (Fontana et al. 2014).

3.2. Regulace vasokonstrikce a vasodilatace

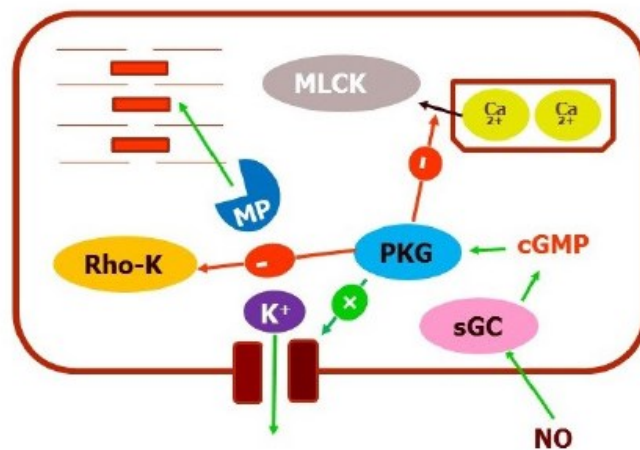
Řízení krevního oběhu zajišťuje poměrně protichůdné požadavky. Na jednu stranu je nutné uspokojit značně rozdílné místní potřeby v jednotlivých tkáních a orgánech na prokrvení a na druhou stranu zajistit celkovou funkci oběhové soustavy, tzn. udržet minutový srdeční objem a tlakový gradient v oběhu. Existují tedy mnohé regulační mechanismy, které zajišťují fungování oběhu jako celku. Lokálně jsou regulovány potřeby určitých tkání a orgánů. Dochází k upravení průtoku krve tkání, přičemž je možná až změna krevního tlaku. Centrální regulace vychází z mozkového kmene. Její úlohou je hlídat a udržovat stálý krevní tlak i přes proměnlivé prokrvení (Trojan et al. 2003: 196–199).

3.2.1. Endotelová regulace

3.2.1.1. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je silně vasodilatační a protizánětlivá signální molekula, produkovaná endotelem pro regulaci krevního toku (Cyr et al. 2020). Do poloviny 80. let byl označován jako endotel dependentní relaxační faktor (EDRF), než byl identifikován jako NO (Klabunde 2009b). Za jeho produkci je odpovědná endoteliální NO syntáza (eNOS). Ta využívá aminokyselinu (AMK) *L*-arginin a molekulární kyslík jako substrát a nikotinamidadenindinukleotid fosfát (NADPH), flavinadenindinukleotid (FAD) a tetrahydrobiopterin (BH₄) jako ko-substrát. Exprese tohoto enzymu je aktivována smykovým třením nebo agonistou (např. bradykininem, acetylcholinem). Molekulárním mechanismem aktivující eNOS je zejména zvýšení intracelulárního Ca²⁺. K tomu dochází stimulací Gq receptorového proteinu. Uvolněný vápník tvoří komplex s kalmodulinem, což aktivuje eNOS (Xia et al. 2014). Aktivita eNOS se v některých případech může zvýšit i nezávisle na Ca²⁺ (Devika a Jaffar Ali 2013).

Oxid dusnatý má velmi krátký poločas, a to jen několik sekund. V krevním řečišti se váže se na hemovou část hemoglobinu, a také na enzym solubilní guanylátcykláza (GC) v buňkách hladkého svalu. Aktivací tohoto enzymu dojde k defosforylaci guanosintrifosfátu (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Tato reakce aktivuje proteinkinázu G (PKG). Ta dává pokyn k relaxaci více mechanismy. První z nich je inhibice vstupu dalšího vápníku směrem do buňky a současné snížení koncentrace intracelulárního kalcia. Druhým mechanismem je aktivace draselných kanálů vedoucí k hyperpolarizaci a následné vasodilataci. Dále blokuje působení provasokonstrikčních Rho-A a kinázy ROCK. Aktivací myosinfosfatázy dochází k defosforylaci myozinu a navození relaxace (viz obr. 4) (Klabunde 2009b, Mladěnka 2018a).



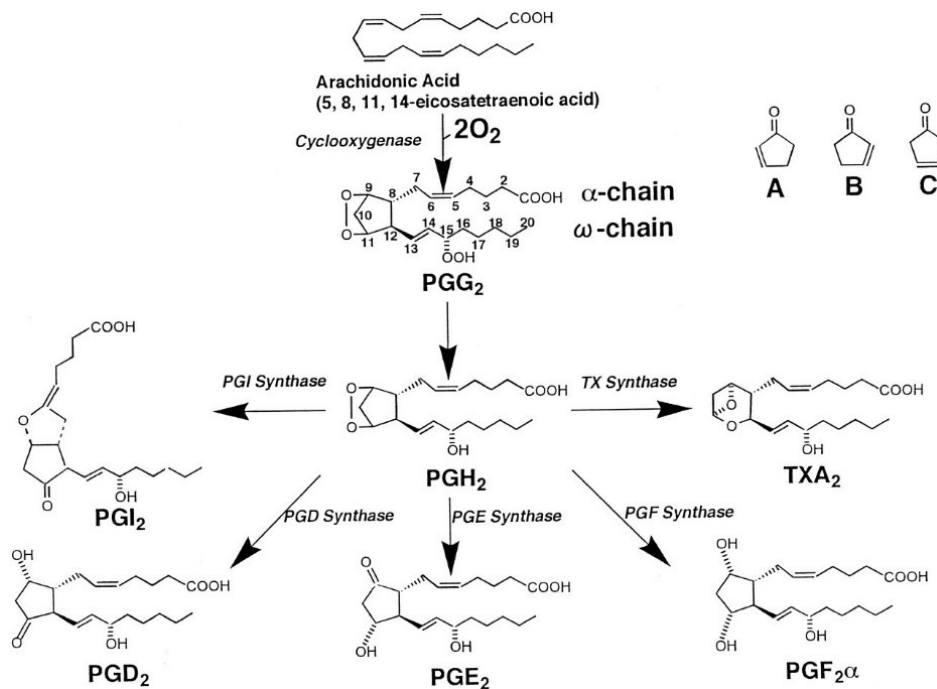
Obr. 4: Relaxační účinek NO na buňku hladkého svalu. Převzato z: Mladěnka 2018a

Endoteliální NO relaxuje cévy, a tedy snižuje krevní tlak. Kromě účinku na hladkém svalu zabraňuje agregaci a adhezi trombocytů či vykazuje antiaterosklerotické a protizánětlivé účinky (Xia et al. 2014). Porucha syntézy NO je součástí endoteliální dysfunkce a vede k patologickým stavům. Tento stav je pravděpodobnější u starších osob a u kuřáků. Zároveň je pozorována nadměrná činnost eNOS přispívající k hypertenzi, diabetu nebo hypercholesterolemii (Zhao et al. 2015).

3.2.1.2. Prostanoidy

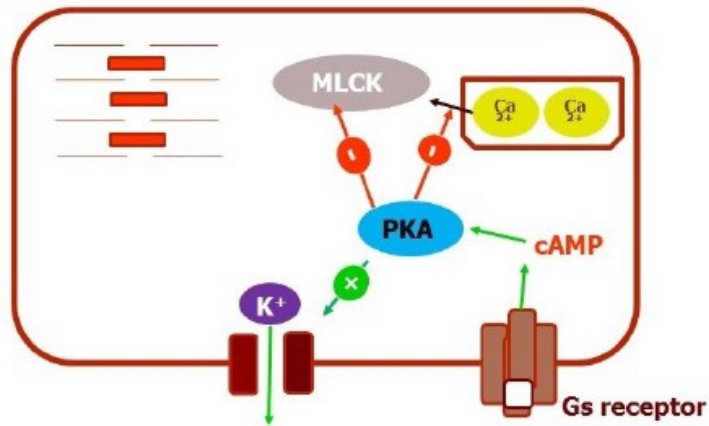
Prostanoidy jsou produkovány mnohými buňkami těla. Primárně se spojují se zánětem a hemostázou, avšak jsou také vasoaktivní a ovlivňují kardiovaskulární funkce. Účinek bývá lokální, pouze v blízkém okolí buněk, jak je u parakrinních hormonů obvyklé. Jedná se o deriváty odvozené od fosfolipidů membrán. Za působení fosfolipázy A₂ (PLA₂) vzniká kyselina arachidonová (AA). AA má dvě důležité metabolizační cesty

(obr. 5). První z nich je cesta 5-lipoxygenázy (5-LO) produkující leukotrieny, jež jsou přítomné při zánětu a poškození tkání. Pro vaskulární systém je významnější dráha enzymu cyklooxygenázy (COX), hlavně COX-1 a COX-2 (Klabunde 2009c). Obě formy dávají vzniku cykloedoperoxidům prostaglandinu G₂ (PGG₂) a následně z něj prostaglandinu H₂ (PGH₂). Jeho transformací pomocí příslušných syntáz vznikají jednotlivé prostaglandiny (PGI₂, PGE₂, atd.) a tromboxan A₂ (TxA₂) (Narumiya et al. 1999).



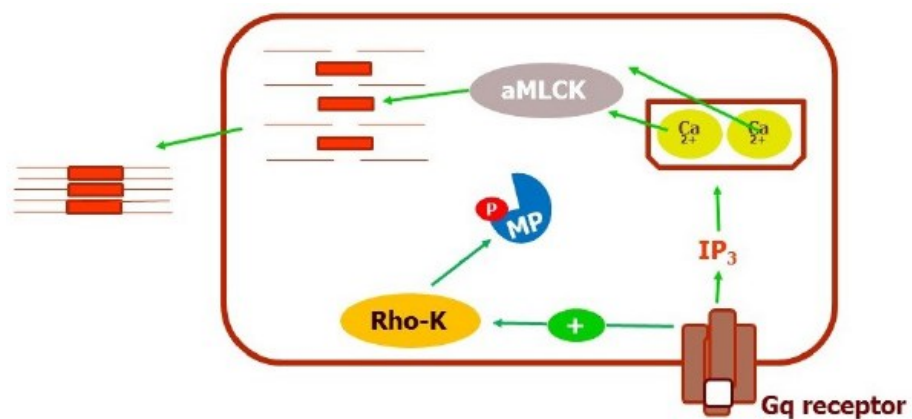
Obr.5: Syntéza prostaglandinů a tromboxanu. Převzato z: Narumiya et al. 1999

Prostaglandiny produkované v hladkém svalstvu – PGE₂ a endotelu – PGI₂ (též nazýván prostacyklin) působí jako vasodilatátory přes G_s proteinový receptor. Mimo to PGI₂ vykazuje inhibiční aktivitu vůči agregaci trombocytů (Klabunde 2009c). Napříč celým tělem ovlivňují řadu fyziologických a patologických jevů. Působí na dýchací ústrojí, trávicí ústrojí, dělohu, regulují funkce ledvin či se účastní zánětlivých procesů (Lincová 2002: 297–298). Receptor spojený s G_s proteinem aktivuje adenylátcyklázu (AC) zabezpečující přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Jeho vyšší intracelulární koncentrace aktivuje proteinkinázu A (PKA). Ta má v buňce řadu funkcí. V cévním hladkém svalu zejména inaktivací MLCK brání reakci aktinu s myozinem vedoucí ke kontrakci. Navíc zabraňuje effluxu vápníku ze SR. Současně také otevírá K⁺ kanály vedoucí k hyperpolarizaci buňky, a tedy relaxaci hladkého svalstva (obr. 6) (Mladěnka 2018a, Wachter a Gilbert 2012).



Obr. 6: Vasodilatace pomocí stimulace Gs proteinu. Převzato z: Mladěnka 2018a

Tromboxan A₂ (TxA₂) se tvoří v destičkách, konkrétně při jejich agregaci v poškozeném endotelu. Nedávno bylo zjištěno, že vzniká i přímo v endotelu. Jeho vlivem dochází k vasokonstrikci, a to působením na receptoru spojeném s Gq proteinem. Tento proteinový receptor stimuluje fosfolipázu C (PLC) spouštějící přeměnu fosfoinositoldifosfátu (PIP₂) na diacylglycerol (DAG) a inositoltrifosfát (IP₃). IP₃ uvolňuje vápník ze SR, zatímco DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC). Zvýšená hladina Ca²⁺ stimuluje MLCK zabezpečující kontrakci. Aktivace membránového receptoru Gq bývá spojena s aktivací jiného membránového receptoru G_{12/13} a aktivací Rho A. Kontrakci zprostředkovává fosforylace MLCP pomocí Rho-kinázy ROCK, která brání defosforylaci myozinu (obr. 7) (Štejfá 2006: 50, Mladěnka 2018a, Wachter a Gilbert 2012).



Obr. 7: Vasokonstrikce pomocí stimulace Gq proteinu. Převzato z: Mladěnka 2018a

3.2.1.3. Endotelin 1

Z více existujících izoforem endotelinů je pro kardiovaskulární systém nejdůležitější vasokonstrikční endotelin 1 (ET-1). Jeho tvorba vychází z prekurzorového proteinu preproendotelinu o velkém množství aminokyselin. Působením endopeptidáz vzniká proendotelin (big endotelin), z něhož pomocí endotelin konvertujícího enzymu (ECE) dochází k přeměně na endotelin-1 o 21 AMK. Sekrece probíhá převážně parakrinně, spíše směrem ke svalové buňce než do lumen. Jeho tvorba je podpořena ve stresové situaci, při tlakovém a objemovém přetížení, při hypoxii nebo pomocí adrenalinu, antidiuretického hormonu (ADH) či angiotenzinu II (AT_{II}). Naopak endotel dependentní relaxační faktor (EDRF), atriální natriuretický peptid (ANP) a prostaglandin I₂ (PGI₂) tvorbě zabraňují (Štejfá 2006: 50).

Po uvolnění ET-1 z endotelové buňky se naváže na svůj receptor v cílové oblasti (hladký sval). Oba základní receptory – ET_A, ET_B jsou spřaženy s Gq proteinem, což vede k tvorbě IP₃. Jeho navýšená hladina zapříčiní uvolnění vápníku ze sarkoplazmatického retikula a dojde ke kontrakci hladkého svalstva (podrobnější mechanismus viz předešlá podkapitola o prostanoidech). ET_A receptor je v krevních cévách dominantní, avšak receptor ET_B je přítomen mimo hladký sval také na endotelu. Celá reakce tedy probíhá prvotním navozením přechodné dilatace (prostřednictvím receptorů v endotelu a podpoře uvolnění NO a prostacyklinu) a následnou vasokonstrikcí (receptory na hladkém svalu). Mimo jiné ET-1 podporuje sekreci aldosteronu, uvolnění atriálního natriuretického peptidu a zpomaluje glomerulární filtraci (Klabunde 2009a).

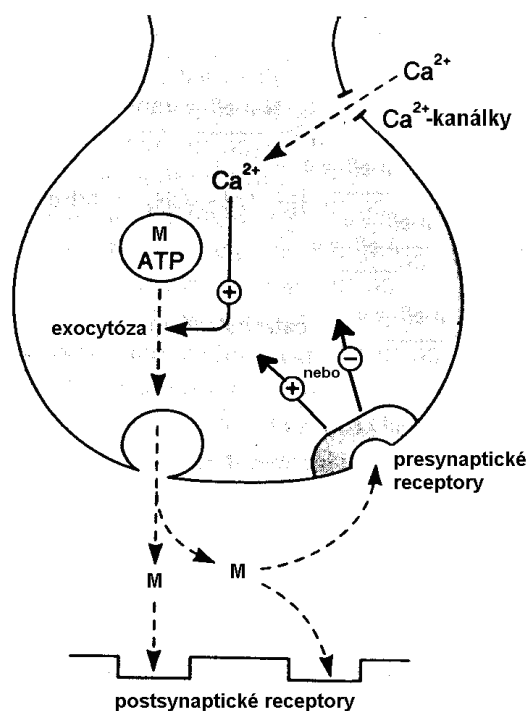
ET-1 má prozánětlivé, hypertrofické a profibrotické vlastnosti na srdce, v ledvinách a cévách. Antagonisté receptoru pro endotelin mohou mít schopnost zabránit komplikacím hypertenze, aterosklerózy, cukrovky a dalším patofyziologickým stavům. Sloužit by však měly pouze při rychlé pomoci a léčbě primární hypertenze (Schiffrin 2005). Antagonisté ET-1 se v klinické praxi uplatní při terapii plicní hypertenze (ambrisentan, bosentan, macitentan). Širší použití komplikují nežádoucí účinky: periferní edémy, reprodukční toxicita u zvířat (Hutyra a Přeček 2017). Endotelin 2 se tvoří hlavně v ledvinách a střevu, endotelin 3 dosahuje vyšších koncentrací v mozku (Štejfá 2006: 50).

3.2.2. Hormonálně-neurogenní regulace

Krevní oběh je centrálně regulován vegetativním nervovým systémem či některými hormony. Rychlost reakce způsobená těmito mediátory bývá v rámci sekund (Štejfa 2006: 42).

3.2.2.1. Vegetativní nervový systém

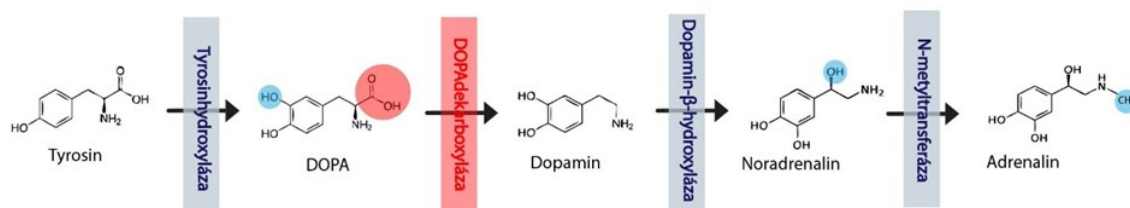
Vegetativní nervový systém (VNS) zajišťuje inervaci většiny orgánů a systémů v organismu. Řídící centrum se nachází v míše, mozkovém kmeni a hypotalamu. Signály jsou do centra vedeny aferentní dráhou. Vyhodnocená odpověď je zpět zaslána eferentní dráhou. Podle odstředivých vláken se VNS dělí na sympatikus a parasympatikus. Přenos nervového stimulu je zprostředkován neurotransmitery. Prvním hlavním neuromediátorem je noradrenalin (NA). Vlákná, která ho uvolňují, se nazývají adrenergní. Druhým důležitým neuromediátorem je acetylcholin (ACH) uvolňovaný z vláken cholinergních. Obě vlákná se skládají ze dvou neuronů – pregangliového a postgangliového. Všechna pregangliová vlákná jsou cholinergní, vlákná postgangliová pak definuje konečný nervový systém. Rozdíl spočívá i v délce jednotlivých neuronů. Pregangliový neuron sympatiku je krátký. Po výstupu z páteřního kanálu vstupuje do sympatického ganglia, odkud vede dlouhý postgangliový neuron do cílové oblasti. Parasympatikus se odlišuje dlouhým pregangliovým neuronem sahajícím až do ganglia, které se nachází v těsné blízkosti stěny orgánu. Postgangliový neuron je velmi krátký (Lincová 2002: 59–66, Fontana et al. 2014, Druga et al. 2013: 86–93). Neuromediátory jsou na nervovém zakončení uvolňovány do synaptické štěrbiny. Nervovým impulzem dochází k depolarizaci presynaptické membrány a otevření kalciových kanálů. Vnikající Ca^{2+} zprostředkovává uvolnění mediátoru exocytózou z axonu do synaptické štěrbiny, kde se mediátor váže na příslušný receptor (Martínková 2007: 135–136). Synaptický přenos je zjednodušeně znázorněn na obr. 8.



Obr. 8: Synaptický přenos. Převzato z: Mladěnka 2018b

3.2.2.1.1. Katecholaminy

Mezi katecholaminy řadíme dopamin, noradrenalin a adrenalin. Syntéza všech třech mediátorů vychází z jednoho prekursoru – AMK *L*-tyrosinu. Nejdříve se pomocí tyrosinhydroxylázy a dopadekarboxylázy tvoří dopamin. Z něj hydroxylací vzniká noradrenalin a posledním krokem syntézy je methylace za vzniku adrenalinu viz obr. 9. V některých částech mozku je konečným produktem dopamin, zatímco například v dřeni nadledvin probíhá kaskáda až do konce (Matouš 2010: 215–218).



Obr. 9: Syntéza katecholaminů. Převzato z: Fontana et al. 2014

Receptory pro katecholaminy jsou spojeny s G proteiny. D_1 a D_5 receptory pro dopamin stimulují reakci adenylátcyklázy (Gs), kdežto zbylé receptory D_2 , D_3 a D_4 ji inhibují (G_i) (Lincová 2002: 137–138). Významnou roli dopamin sehrává v centrální nervové soustavě (CNS) řízením motoriky a iniciací vzorců chování. Hypofunkce

dopaminergních nervových drah vedou k degenerativním změnám jako je například Parkinsonova choroba. Naopak jejich hyperfunkce způsobuje poškození vzorců chování. Důkazem je schizofrenie nebo rozvoj závislostí (Fontana et al. 2014). V periferních oblastech dopamin podporuje natriurézu a vykazuje účinky na kardiovaskulární systém. V nízkých koncentracích působí vasodilatačně (stimulace D_1), s rostoucí koncentrací způsobuje vasokonstrikci (β_1 a následně i α_1) (Martínková 2007: 121).

Produkce adrenalinu (A) s noradrenalinem (NA) probíhá převážně v dřeni nadledvin. Odtud jsou přenášeny krví do jednotlivých orgánů a tkání. Účinkování noradrenalinu v nervové soustavě jako neurotransmiteru působí pouze parakrinně – ovlivňuje pouze své okolí, například hladký cévní sval (Rokyta 2015: 481–489). *Odpověď hladkého svalstva cév na katecholaminy není jednotná a je určována typem přítomných adrenergických receptorů* (Kittnar 2011: 182). V současnosti se rozeznávají dva typy postsynaptických receptorů – α a β , z nichž každý má ještě dva hlavní podtypy. V cévách se zejména uplatní dva typy: α_1 a β_2 . Receptor α_1 je spojený s Gq proteinem aktivující přeměnu PIP_2 na DAG a IP_3 pomocí fosfolipázy C. Dochází k aktivaci PKC a uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula. β_2 receptory (Gs) stimulací adenylátcyklázy spouští známou přeměnu ATP na cAMP, čímž dojde k aktivaci PKA. Jejím účinkem v hladkosvalové buňce dochází k snížení koncentrace Ca^{2+} a naopak zvýšení koncentrace draslíku v buňce. Tuto kaskádu naopak inhibují aktivované α_2 receptory (Gi) (Wachter a Gilbert 2012).

Vasokonstrikce hladkého svalu je spojena s aktivací α_1 receptorů. Ovlivněno je podkoží, splachnická oblast, sliznice i velké cévy. Reakcí na svalový stah je zvýšení krevního tlaku. Receptory α_2 jsou důležité v centrální nervové soustavě, kde potlačují aktivitu sympatiku. Na periférii jsou umístěny jak v hladkém cévním svaly, tak v endotelu. Stimulací β_2 receptorů dochází k vasodilataci závislé na endoteliálním uvolnění NO. Aktivací tohoto receptoru dilatují hladké svaly bronchů či se zvyšuje prokrvení kosterní svaloviny, což navozuje její třes (Lincová 2002: 78–79). Obecně platí, že noradrenalin v cévách aktivuje pouze α receptory (na β_2 nepůsobí), kdežto adrenalin aktivuje oba receptory. Záleží tedy na jejich převaze v cílové tkáni a dle toho se řídí výsledná reakce (Trojan et al. 2003: 208–209).

Na postsynaptické receptory nasedají a k následnému účinku se spotřebovává pouze malé množství katecholaminů. Stimulace presynaptických receptorů –

autoreceptorů ovlivňuje další vylučování NA dle koncentrace v synaptické štěrbině. Presynapticky se vyskytují α_2 receptory a jejich stimulace zabraňuje dalšímu uvolnění NA do štěrbin. Opačný efekt vykazují presynaptické β_2 receptory, kdy dochází k dalšímu uvolňování NA (Matouš 2010: 403–415, Štejfa 2006: 44–46). Ze synaptické štěrbiny může být NA reabsorbován kotransportem s Na^+ a Cl^- , vychytáván zpět do vezikul a recyklován nebo štěpen monoaminoxidázou (MAO). Na degradaci se podílí i enzym katechol-O-methyltransferáza (COMT), jež se nachází v postsynaptické buňce. Výsledným produktem je poté kyselina vanilmandlová (Lincová 2002: 72–73).

3.2.2.1.2. Acetylcholin

Syntéza acetylcholinu probíhá působením enzymu cholinacetyltransferáza (CAT). Takto vytvořený ACH se strukturou kvarterní amoniové sloučeniny je ukládán v nervových zakončeních do vezikul. Po uvolnění do synaptické štěrbiny se váže na dva typy svých receptorů: nikotinové a muskarinové (Rokyta 2015: 484).

Muskarinové receptory jsou spřáhány s G proteinem. Rozlišuje se až pět podtypů, přičemž nejvíce zastoupeny jsou první tři podtypy. M_1 receptory se vyskytují zejména v centrální nervové soustavě a na sliznici žaludku. M_2 receptory působí na srdeční tkáni. Hladký sval a žlázy ovlivňuje acetylcholin navázáním na receptor M_3 . Ten je spojen s Gq_{11} proteinem, jehož aktivací se zvyšuje intracelulární hladina vápníku. To obecně vede ke zvýšené sekreci žláz a kontrakci hladkého svalu orgánů. Účinek na cévní sval je však opačný – vasodilatační. Acetylcholin totiž přímo neovlivňuje hladký sval cévy, nýbrž v endotelu stimuluje produkci vasodilatačního PGI_2 a NO. Presynapticky se vyskytuje receptor M_2 , jehož stimulace brání dalšímu uvolňování ACH (Fontana et al. 2014, Lincová 2002: 101–102).

Nikotinové receptory jsou spojeny s iontovým kanálem, který je propustný zejména pro Na^+ , dále také pro K^+ a některé typy i pro Ca^{2+} . N_N typ receptoru se vyskytuje na postsynaptických gangliích sympatiku i parasimpatiku a je zodpovědný za přenos vzruchu. N_M receptor se nachází na nervosvalové ploténce. Jeho aktivace vede k depolarizaci a ke kontrakci kosterního svalu (Martínková 2007: 105–117). Aktivované presynaptické nikotinové receptory umožňují další vstup ACH do štěrbin (Lincová 2002: 100).

Degradace acetylcholinu probíhá za působení acetylcholinesterázy (ACHE). Ta je vázána na postsynaptické membráně, přičemž rozkladná reakce probíhá směrem

do štěrby za vzniku cholinu a acetátu. Ve tkáních potom rozklad probíhá za účinku butyrylcholinesterázy, též známé jako pseudocholinesteráza (Martínková 2007: 105–117). Účinky vegetativního nervového systému na vybrané orgány shrnuje tab. 1.

Tab.1: Účinky sympatiku a parasympatiku na cílové orgány

	VLIV SYMPATIKU	VLIV PARASYMPATIKU
SRDCE	zrychlení akce	zpomalení akce
KORONÁRNÍ TEPNY	rozšíření	zúžení
PERIFERNÍ TEPNY	zúžení (vzestup TK)	rozšíření (pokles TK)
BRONCHY	rozšíření	zúžení
ŽALUDEK + STŘEVA	útlum peristaltiky	zvýšení peristaltiky
ŽLÁZY GIT	útlum sekrece	zvýšená sekrece
MOČOVÝ MĚCHÝŘ	uvolnění m. detrusor	kontrakce m. detrusor
GENITÁL	kontrakce cév, ejakulace, sekrece	relaxace cév, erekce
ZORNICE	mydriáza	mióza
POTNÍ ŽLÁZY	zvýšená sekrece	
SLINNÉ ŽLÁZY	hustá slina	řidká slina
METABOLISMUS	katabolismus	anabolismus
TEPLOTA	zvýšení	snížení
NADLEDVINY	zvýšená činnost	snížená činnost

Převzato a upraveno dle: Druga et al. 2013: 87

3.2.2.2. Serotonin

Serotonin neboli 5-hydroxytryptamin (5-HT) je tvořen z aminokyseliny *L*-tryptofanu. Ačkoliv se většinou vyskytuje ve stěnách trávicího ústrojí, nachází se také v nervovém systému a cévním okolí. Podílí se na regulaci kontrakce hladké svaloviny gastrointestinálního traktu zajišťující peristaltiku. Jako mediátor centrální nervové soustavy reguluje stavy bdělosti a spánku, kognitivní funkce, sexuální chování a indukuje zvracení. Vylučován je po mechanickém nebo nervovém podnětu. V krevním řečišti je vychytáván trombocyty a plní tak funkci lokálního hormonu. Případný volný serotonin se rychle degraduje prostřednictvím monoaminoxidázy A (MAO-A) (Martínková 2007: 266–267).

V současné době je rozpoznáváno sedm podtypů serotoninových receptorů, přičemž podtypy 1 a 2 se ještě dále dělí. Všechny podtypy jsou spřaženy s G receptorovým proteinem. Výjimkou je receptor 5-HT₃, který je spojen s iontovým kanálem pro Na⁺-K⁺-Ca²⁺. V cévním hladkém svalstvu serotonin přímo stimuluje receptor 5-HT_{2A}. Dochází k výrazné vasokonstrukci velkých cév a agregaci trombocytů, které na svém povrchu nesou tentýž receptor. Za účinkem stojí aktivace fosfolipázy C.

Mechanismus je tedy závislý na Gq receptorovém proteinu. V CNS serotonin stimuluje cévní endotelové buňky nesoucí 5-HT₁ receptor spojený s Gi proteinem. Tento receptor působí v hladkém svalu opačně vůči Gs proteinu, a to inhibicí AC a poklesem tvorby cAMP. V endotelu se ale paradoxně podílí na vasodilataci pomocí posttranslační aktivace eNOS. V periférii působí na endotel odporových cév prostřednictvím receptoru 5-HT₇ (stimulace Gs) a 5-HT₂ (stimulace Gq) a dochází k vasodilataci (Mladěnka 2018a, Lincová 2002: 136–138).

3.2.2.3. Vasopresin

Antidiuretický hormon (ADH) neboli vasopresin je látka působící na distální tubulus a sběrací kanálky v ledvinách. Uvolňuje se z neurohypofýzy při nedostatku mimobuněčné tekutiny v organismu a s tím související hypovolemií a hypotenzí. Jeho účinkem dojde k zadržování vody sníženým vylučováním moči. Vasopresin podporuje uvolňování koagulačních faktorů vaskulárním endotelem a zvyšuje agregovatelnost krevních destiček. Zvýšené uvolňování se vyskytuje také při aktivaci sympatiku. Negativně je sekrece ovlivněna chladem, kofeinem nebo alkoholem (Rokyta 2015: 306, 349, Brunton et al. 2011: 701–710).

Vasopresin se váže na tři typy receptorů (V_{1a}, V_{1b}, V₂). Nejrozšířenější z nich je V_{1a} receptor. Nachází se v hladkém svalstvu cév, močovém měchýři, nadledvinách, na krevních destičkách, epitelu sběrných kanálků a mnoha dalších strukturách, zejména v centrální nervové soustavě. V_{1b} receptory se vyskytují převážně na hypofýze. Navázáním na tyto receptory, které jsou spřažené s Gq proteinem, navodí rychlou vasokonstrikci. Mimo to dochází k agregaci trombocytů, glykogenolýze, růstu buněk hladkého svalstva a uvolňování adrenokortikotropního hormonu (ACTH). V₂ receptory jsou lokalizovány převážně v ledvinách, avšak přítomny jsou také na vaskulárním endotelu. Zmíněný receptor se pojí s Gs proteinem. Po jeho stimulaci a následné aktivaci proteinkinázy A adenylátcyklázou dochází k zpětné resorpci vody pomocí otevírání akvaporinů v distálním tubulu a sběracím kanálku. Na koncentraci ADH závisí počet otevřených akvaporinů. Celý účinek posiluje zvýšené vylučování močoviny a sodných iontů (Brunton et al. 2011: 701–710, Kittnar 2011).

3.2.2.4. Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy jsou hormony produkované v kardiomyocytech – atriální natriuretický peptid (ANP) a mozkový natriuretický peptid (BNP). ANP je skladován

v granulích a jeho uvolnění nastává i po menším stimulu. Naopak BNP v granulích skladován není a je vylučován nárazově. V cévním endotelu se nachází třetí natriuretický peptid (NP) – C natriuretický peptid (CNP) (Daniels a Maisel 2007). K vylučování ANP a BNP dochází jako odpověď na volumovou expanzi a tlakové zatížení srdce. Neustále zvýšená hladina se tak objevuje u patologických stavů jako je chronické srdeční selhání (Málek 2016). Svým účinkem působí proti uvolňování endotelinu, vasopresinu a aktivaci osy renin-angiotenzin-aldosteron. Oba peptidy vedou k vasodilataci, natriuríze, diuréze a inhibují proliferaci buněk (Vítovec et al. 2017: 59). CNP působí pouze lokálně k regulaci tonu cév a brání strukturální cévní přestavbě (Málek 2016). Podílí se také na stimulaci růstu dlouhých kostí (Brunton et al. 2011: 64).

Na povrchu cílových buněk se vyskytují tři typy receptorů pro natriuretické peptidy – NPR-A, NPR-B, NPR-C. Afinita k těmto receptorům je v rámci peptidů odlišná. ANP se nejvíce váže na NPR-A, CNP je přednostně vychytáván receptorem NPR-B. Prostřednictvím membránového receptoru NPR-C jsou vázány všechny tři NP a je tak zajišťována jejich rovnováha v těle. Strukturálně si velmi podobné receptory typu A a B jsou spojeny s transmembránovou guanylátcyklázou a aktivací její solubilní formy pomocí NO za tvorby cGMP jako druhého posla. CNP prostřednictvím membránového receptoru NPR-C aktivuje membránovou guanylátcyklázu pGC a tím i vznik cGMP (Brunton et al. 2011: 64–65, Málek 2016). Degradace peptidů je zprostředkována neutrálními endopeptidázami a vazbou na clearensový receptor NPR-C (Štejfá 2006: 51–52).

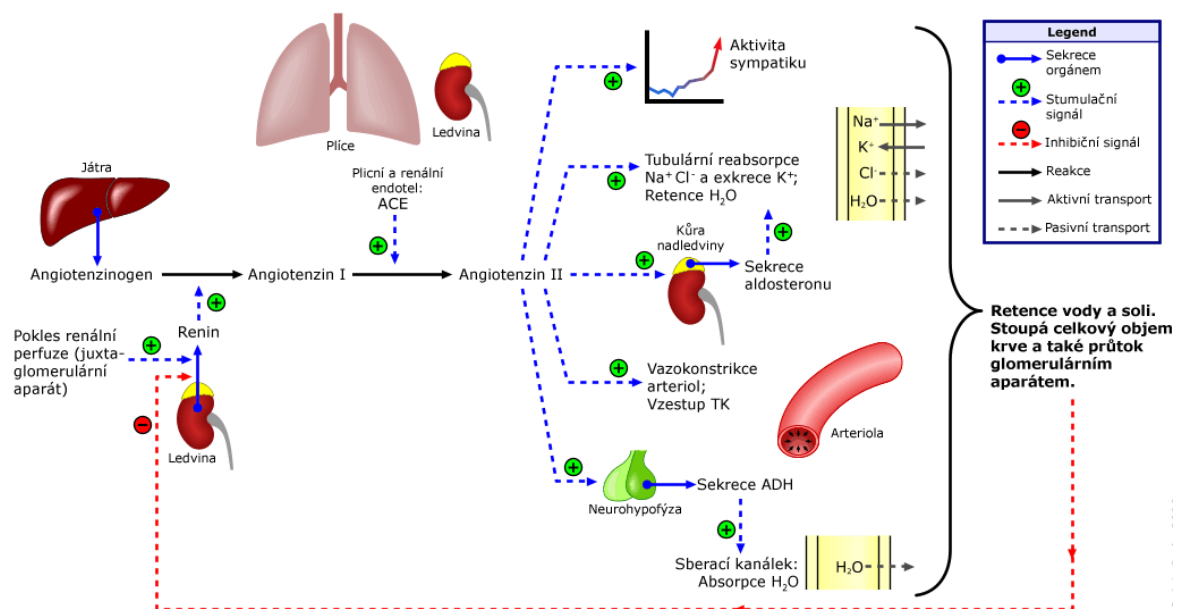
3.2.3. Enzymatická regulace

3.2.3.1. Systém renin-angiotenzin-aldosteron

Systém renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) je základním mechanismem pro regulaci a udržení homeostázy a krevního tlaku (Špác 2016). Renin je peptidáza vznikající v juxtaglomerulárních buňkách ledvin. Slouží jako katalyzátor přeměny angiotenzinogenu na angiotenzin I. Pomocí angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACE) je dále přeměněn na angiotenzin II (AT_{II}). ACE se nejvíce vyskytuje v endotelu plicních a renálních cév (Špinar a Vítovec 2010). AT_{II} byl dříve nazýván jako hypertenzin. Tento název byl odvozen od jeho schopnosti vyvolat vasokonstrikci a zvýšit krevní tlak, a to s mnohem větší účinností než NA. Mimo to působí na kůru nadledvin, čímž dochází k vyplavení aldosteronu a katecholaminů. Dále stimulací synaptických neuronů podporuje uvolnění NA a vlivem na renální tubuly zvyšuje zpětnou resorpci Na⁺.

Působením na mozek snižuje citlivost baroreceptorů a zvyšuje příjem vody (Ganong 2005: 459–463). Iniciátorem tohoto systému je pokles krevního tlaku ve *vas afferens*. RAAS je aktivován jako kompenzační mechanismus při působení vasodilatačních endotelových působků, při sníženém obsahu chloridu sodného v distálních tubulech a stimulací α_1 a β_1 receptorů v ledvinách. Během 20 minut je systém plně funkční ve snaze zabezpečit homeostázu (Kittnar 2011: 184–185, Štejfa 2006: 47–49).

Angiotensin II působí na 2 receptory – AT_1 a AT_2 . Receptor AT_1 je sprzęžen s Gq proteinem (Matouš 2010: 450). *Působení angiotenzinu II na AT_1 vede ke zvýšené retenci sodíku, vazokonstrikci (včetně preferenčního zúžení eferentní arterioly ledvin), stimulaci žízně a touhy po soli, zvýšené aktivitě sympatického nervového systému a uvolňování aldosteronu z nadledvin* (Ames et al. 2019). Působením na druhý receptor AT_2 dochází k protiregulačnímu působení proti AT_1 . Aktivace receptoru vede k protizánětlivým, antifibrotickým a vasodilatačním účinkům. Hlavní roli sehrávají ve fetální tkáni, v dospělosti jsou exprimovány minimálně. Receptor je spojen s Gs proteinem za snížení koncentrace vápníku a navýšení koncentrace draslíku v buňce (Ames et al. 2019, Brunton et al. 2011: 726–727). Příznivý efekt receptoru je také spojován s antiproliferačním účinkem a aktivací bradykininu a NO (Kaschina et al. 2017). Shrnutí renin-angiotenzin-aldosteron systému je znázorněno na obr. 10.



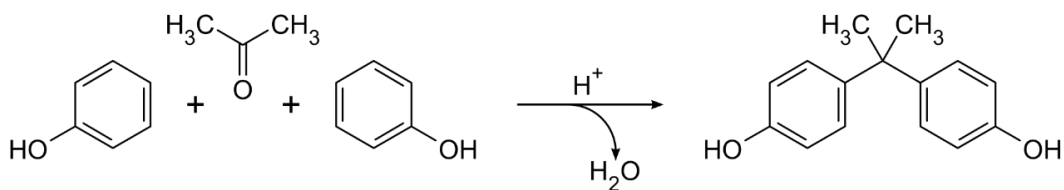
Obr. 10: Renin-angiotenzin-aldosteron systém. Převzato z: Wikiskripta.eu, Renin-angiotenzin-aldosteronový systém 2011

3.2.3.2. Kininový systém

Kininy jsou vasodilatační peptidy pro jejichž tvorbu je nutná proteáza kalikrein. Plazmatický kalikrein koluje řečištěm v inaktivní formě. Tvoří se z kininogenu při zánětlivých procesech, krevním srážení a poškození tkáně. Jeho aktivací vzniká nejznámější nonapeptid bradykinin. Účinek bradykininu je především vasodilatace cévní svaloviny prostřednictvím NO a prostanoidů. Zvyšuje cévní propustnost, snižuje krevní tlak, zvyšuje sekreci katecholaminů a stimuluje kontrakci viscerální svaloviny. Stimulací nervových zakončení dokáže indukovat bolest. Uplatňuje se také u zánětů a edémů. Receptory pro bradykinin jsou dvojího typu, oba spojené s G proteinem (Ganong 2005: 600–601, Silbernagl a Lang 2012: 294). V endotelu a hladkém svaly se bradykinin váže na receptor B₂, který je téměř identický s receptorem pro histamin H₂. Receptor je spojen s G_q proteinem, který navozuje známou kaskádu DAG a IP₃, přičemž dojde k aktivaci PKC. Zvýšením hladiny vápníku je stimulována PLA₂ a eNOS. Důsledkem je vasodilatace způsobená uvolněním NO a PGI₂ (Moreau et al. 2005). Degradace bradykininu je rychlá. Umožněna je prostřednictvím kinináz, z nichž nejvíce účinná je kinináza II shodná s angiotenzin-konvertujícím enzymem (ACE) (Štejfá 2006: 52).

3.3. Bisfenoly

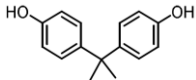
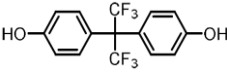
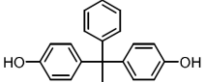
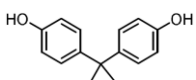
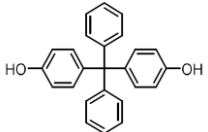
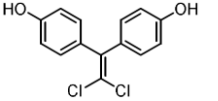
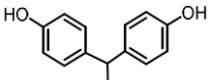
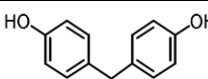
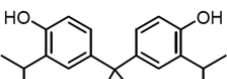
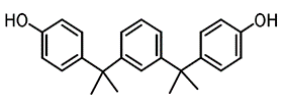
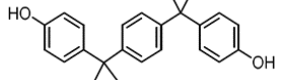
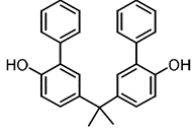
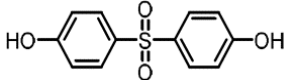
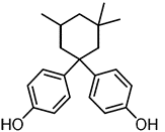
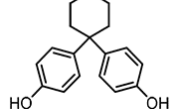
Bisfenoly jsou rozsáhlá skupina organických sloučenin, přesněji skupina fenolů. Jejich přesný název dle International Union of Pure and Applied Chemistry (UIPAC) je 4,4'-dihydroxy-2,2-difenylypropan. Roku 1905 byl poprvé syntetickou reakcí připraven bisfenol A (BPA), a to kondenzací fenolu s acetonem za využití kyselého prostředí jako katalyzátoru (obr. 11). Jako kondenzační činidlo se využívá kyselina sírová, chlorovodíková nebo fosforečná. Po této reakci je nutno produkt ještě predestilovat, jelikož čistota by měla dosahovat přes 99,80 %. Velmi dobře se rozpouští v ethanolu, diethyletheru, kyselině octové, méně rozpustný je ve vodě (Skledar a Mašič 2016, Mikołajewska et al. 2015, Fišera a Králik 1997).



Obr. 11: Syntéza bisfenolu A. Převzato z: Cs.wikipedia.org, Bisfenol A 2010

Skupina bisfenolů je široce využívána u polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic, a to hlavně pro výrobu potravinových obalů, kovových plechovek, laků, knih, novin, ale také zdravotnických prostředků, brýlových čoček, spotřební elektroniky či hraček. Celková produkce bisfenolu A v roce 2013 dosahovala téměř 7 milionů tun. Současně se také zvedá produkce ostatních typů bisfenolů, což je spojováno s nahrazováním BPA. Z množství bisfenolů je nejznámější, a taktéž nejvíce využívaný, bisfenol A a jeho analogy, například bisfenol AF (BPAF), kterému se v rámci této práce budu věnovat. Od BPA se liší přítomností dvou trifluormethylových skupin namísto methylových. Nejen BPAF, ale i další analoga je možno vidět v tab. 2 (Maćczak et al. 2015, Skledar a Mašič 2016).

Tab. 2: Struktury bisfenolů a jejich funkce

BP	Struktura	Log Kow	Využití	Zdroj expozice
BISFENOL A (BPA)		3,43	Polykarbonátové plasty, epoxidové pryskyřice	Termopapír, prach, jídlo a nápoje, textil a produkty osobní péče
BISFENOL AF (BPAF)		4,47	Epoxidové pryskyřice, nátěry	Jídlo a nápoje, prach, dentální materiály, textil a produkty osobní péče
BISFENOL AP (BPAP)		4,86	Epoxidové pryskyřice, nátěry	Nápoje a jídlo, termopapír, prach, textil
BISFENOL B (BPB)		4,13	Epoxidové pryskyřice, nátěry	Nápoje a jídlo, prach, textil
BISFENOL BP (BPBP)		6,08	Polykarbonátové plasty, zpomalovače hoření	Plastové produkty, nábytek
BISFENOL C (BPC)		3,74	Polykarbonátové plasty, zpomalovače hoření	Termopapír, textil
BISFENOL E (BPE)		3,19	Polykarbonátové plasty, nátěry	Jídlo, nápoje, textil
BISFENOL F (BPF)		3,06	Nátěry, laky	Jídlo, textil, prach, lepidla, laky
BISFENOL G (BPG)		6,55	Polykarbonátové plasty, epoxidové pryskyřice	Dentální materiály
BISFENOL M (BPM)		6,25	Polykarbonátové plasty, termoplasty	Dentální materiály, plastové produkty
BISFENOL P (BPP)		6,25	Polykarbonátové plasty, epoxidové pryskyřice	Jídlo, prach
BISFENOL PH (BPPH)		7,17	Polykarbonátové plasty, epoxidové pryskyřice	Jídlo a nápoje
BISFENOL S (BPS)		1,65	Nátěry, barviva, produkty na činění kůží	Jídlo a nápoje, termopapír, prach, textil
BISFENOL TMC (BPTMC)		6,29	Polykarbonátové plasty, epoxidové pryskyřice, polyestery	Dentální materiály, prach
BISFENOL Z (BPZ)		5,00	Nátěry, polykarbonátové plasty	Textil, produkty osobní péče, jídlo

Převzato a upraveno z: Lucarini et al. 2020

3.3.1. Účinky v organismu

Pro bisfenoly je k dispozici mnoho literatury, která poukazuje na celou řadu nevhodných zdravotních důsledků po jejich expozici. Tyto důkazy byly přezkoumány několika organizacemi (Lucarini et al. 2020). Díky mnoha studiím, ačkoliv jsou věnovány nejvíce BPA, je zřejmé, že lze měřit dosažené hladiny v séru, moči, plodové vodě, placentě, pupečnickové krvi a folikulární tekutině (Vandenberg et al. 2007). Zjištěna byla schopnost deponovat v lidském séru, moči, mateřském mléce i vlasech. Zejména BPA je považován za látku toxickou v oblasti reprodukce. V roce 2017 dokonce Evropská chemická agentura (ECHA) zařadila BPA na seznam látek s nepříznivými účinky na kognici, metabolismus a zmiňovanou reprodukci vzhledem k schopnosti narušení endokrinního systému. Bylo prokázáno, že endokrinní disruptor se váže na receptor pro estrogen, kdy napodobuje jeho působení *in vivo*. Interaguje také s několika dalšími endokrinními cestami pro hormony štítné žlázy, androgeny a glukokortikoidy. Přesné mechanismy působení ještě nejsou zcela známy. Největším rizikem se jeví expozice BPA u malých dětí v důsledku větší zranitelnosti vyvíjejících se orgánů. U těchto dětí se objevují poruchy učení, paměti, hyperaktivita, ale například také diabetes mellitus a obezita. V pozdějších stádiích života je jistá souvislost také s karcinomem prostaty či prsu a další řadou nemocí i po expozici nízkým dávkám. Vzhledem k neznámému mechanismu účinku je nejlepším řešením prevence. Vhodným se jeví omezení, nejlépe zákaz použití této látky při výrobě kojeneckých lahví. Tak tomu je například v Evropě, Kanadě či Spojených státech amerických. V neposlední řadě byla zjištěna u všech bisfenolů schopnost vyvolat změny v hemolýze a morfologii krevních buněk, kdy nejvíce cytotoxický se jeví BPAF. Vykazují také oxidaci hemoglobinu v erytrocytech, což platí hlavně pro BPA (Lucarini et al. 2020, Maćczak et al. 2015, Thoene et al. 2018).

Bisfenoly se do lidského těla mohou dostat požitím, vdechnutím či dermální cestou. Vyskytují se ve formě polymerů, ve kterých jsou vázány esterovými vazbami a tyto vazby mohou být snadno hydrolyzovány. K této situaci dochází za zvýšené teploty nebo v zásaditém/kyselém prostředí. Díky těmto skutečnostem jsou nejčastěji a velmi ochotně přijímány orální cestou. Jelikož se bisfenoly vyskytují také ve vzduchu, a hlavně v prachu, je uvěřitelné, že existují případy po expozici dítěte hrajícího si na zemi, které si následně dává ruce do úst. Nicméně tlak par bisfenolů je natolik nízký, že důležitost takové expozice je téměř zanedbatelná. Na základě mnoha výzkumů byla stanovena hranice pro tolerovaný denní příjem této sloučeniny pro člověka na 0,05mg/kg.

Karolina Mikolajewska et al. (2015) ve svém článku zmiňuje různé zdroje, ve kterých byla zkoumána hladina BPA v hovězím mase či v tuňáku. Tato hranice vždy dosahovala výrazně nižších hodnot než zmiňovaná denní bezpečná hodnota.

3.3.2. Kardiovaskulární účinky

První zmínky o kardiovaskulárních chorobách v souvislosti se zvýšenou hladinou BPA v těle se začaly objevovat kolem roku 2003 na základě údajů Národního průzkumu zdraví a výživy (NHANES). U účastníků šetření se vyskytovaly případy infarktu myokardu, anginy pectoris a onemocnění koronárních artérií. Expozice populace bisfenolům je riziková nejen pro uvedená onemocnění srdce, ale i pro periferní oběhový systém. Jisté studie naznačují, že akutní i chronická expozice BPA může ovlivnit fungování kardiovaskulárního systému i při relativně nízké koncentraci. U subjektů tak dochází k arytmiím, remodelaci srdce, hypertenzi či ateroskleróze (Gao a Wang 2014).

Bylo zjištěno, že bisfenoly se vážou na membránové estrogenní receptory (ER) a jsou tedy spojeny s kaskádou G proteinu. Jeho aktivace vede k úpravě hladiny Ca^{2+} v buňce. Kromě toho látky skupiny bisfenolů ovlivňují iontové kanály a zasahují do oxidačního stresu, konkrétně ovlivňují NO. V závislosti na koncentraci bisfenolů se zvyšuje tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a antioxidantních enzymů jako je superoxid dismutáza. Studie prokázaly i významné snížení mitochondriálních funkcí, což může vyvolat kardiotoxicitu. Zvyšování kardiotoxicity ovlivňuje i možná fosforylace eNOS. Dle studie Shoufei Yanga zvýšená aktivita tohoto enzymu podporuje hypertrofii kardiomyocytů. Nízké koncentrace však toxicitu srdečních buněk nepopisují (Yang et al. 2020, Feiteiro et al. 2018).

Joana Feiteiro et al. (2018) ve své studii analyzovala účinky bisfenolu A na vaskulární hladký sval. Z výsledků studie vyplývá, že BPA inhibuje vápenaté iontové kanály, a tím dochází k vasorelaxačnímu účinku, jež je nezávislý na endotelu. Nicméně účinky bisfenolů na kardiovaskulární systém ještě nejsou zcela pochopeny a je potřeba je dále zkoumat.

4. Cíl práce

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo otestovat vasodilatační aktivitu bisfenolu AF *ex vivo* na izolované aortě potkana a ověřit možný mechanismus vasodilatačního účinku.

5. Experimentální část

5.1. Pokusná zvířata a materiální vybavení

5.1.1. Pokusná zvířata

Experiment byl prováděn na laboratorních potkanech kmene Wistar. Používání byli samci o hmotnosti 300–400 g. Před samotným experimentem byla zvířata minimálně sedm dní chována ve viváriu, které je součástí Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Krmena byla peletizovanou stravou a po celou dobu měla volný přístup k pitné vodě. Dodavatelem zvířat byla firma Charles River (Německo).

Veškeré pokusy probíhaly v souladu se zákonem č.246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

5.1.2. Chemikálie a látky

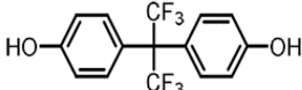
Tab. 3: Chemikálie použité na výrobu Krebsova cyklu

Název	Vzorec	Mr	Výrobce
Chlorid sodný p.a.	NaCl	58,44	Penta Chrudim, Česká republika
Chlorid draselný p.a.	KCl	74,56	Lachema Brno, Česká republika
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	CaCl ₂	110,99	Lachema Brno, Česká republika
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	NaHCO ₃	84,01	Penta Chrudim, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH ₂ PO ₄	136,09	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česká republika
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	MgSO ₄ .7H ₂ O	246,47	Lachema Brno, Česká republika
D-glukóza monohydrát p.a.	C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O	180,16	Penta Chrudim, Česká republika

Tab. 4: Vasoaktivní látky

Název	Výrobce
Noradrenalin	Sigma Aldrich, Německo
Acetylcholin	Sigma Aldrich, Německo
Nitroprusid sodný	Sigma Aldrich, Německo
Atropin	Sigma Aldrich, Německo
Nifedipin	Sigma Aldrich, Německo
L-NAME	Sigma Aldrich, Německo
TRAM-34	Sigma Aldrich, Německo
UCL-1684	Tocris Bioscience, Velká Británie
BayK-8644	Sigma Aldrich, Německo

Tab. 5: Zkoumaná látka

Název	Vzorec	Výrobce
Bisfenol AF		Sigma Aldrich, Německo

Při experimentu byly dále použity tyto látky

- Dimethylsulfoxid (DMSO) jako rozpouštědlo (Sigma Aldrich, Německo)
- Uretan jako anestetikum (Sigma Aldrich, Německo)
- Heparin jako antikoagulans
- Destilovaná voda

Krebsův roztok

Živným médiem byl izotonický Krebsův roztok o pH 7,4. Pro jeho vlastnosti podobné lidské plazmě napodobuje potřeby vnitřního prostředí. Všechny látky (tab. 6) s výjimkou chloridu vápenatého byly rozpuštěny v malém množství destilované vody. V oddělené kádince s menším množstvím destilovanou vodou byl rozpuštěn chlorid vápenatý, aby nedošlo k vysrážení vápenatých solí. Tento roztok byl následně smíchán s roztokem ostatních látek. Výsledný roztok jsme dostali doplněním destilované vody na požadovaný objem.

Tab. 6: Složení Krebsova roztoku

Název látky	Koncentrace (g/l)
Chlorid sodný p.a.	5,54
Chlorid draselný p.a.	0,35
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	0,28
Hydrogenuhlíčan sodný p.a.	2,1
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	0,16
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	0,29
D-glukóza monohydrát p.a.	2,1

5.1.3. Přístrojové vybavení a pomůcky

- Aparatura pro izolovanou tkáň *ex vivo* (Experimentia Ltb., Maďarsko)
- Vyhodnocovací software, S.P.E.L., Advanced Kymograph Software SOFT-03-KYMO (Experimentia Ltb., Maďarsko)
- Termostat U1 (Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Německo)
- Třepačka IKA Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn GmbH, Německo)
- Software GraphPad Prism, verze 6
- Plynová láhev pneumoxidu – směs 95 % O₂ a 5 % CO₂ (Linde gas, Česká republika)
- Laboratorní nádobí – kádinky, odměrný válec, tyčinka, Petriho misky, mikropipety, lžičky atd.
- Operační nástroje – peán, pinzety, nůžky, jehly, injekční stříkačky

5.2. Metodika práce

5.2.1. Příprava

Potkan byl po dobu 24 hodin před experimentem ponechán nalačno. Následně mu bylo intraperitoneálně podáno anestetikum uretan o koncentraci 20 g/100ml v dávce 1,2 g/kg. Objem anestetika se vypočítal dle přesné hmotnosti zvířete (tab. 7). Následně byl zvířeti intravenózně aplikován heparin proti srážlivosti krve.

Tab. 7: Objem anestetika dle hmotnosti zvířete

váha (g)	200	225	250	275	300	325	350	375	400
Objem (ml)	1,2	1,35	1,5	1,65	1,8	1,95	2,1	2,25	2,4

Smrt nastala vykrvením. Břišní dutina se podélně nastříhla a zvíře bylo vykrveno odběrem jehlou z břišní aorty. Následně mu byla otevřena i hrudní dutina, z níž se opatrně vyjmula hrudní část aorty. Pro zajištění její aktivity byla ihned vložena do připravené Petriho misky s Krebsovým roztokem. Céva se co nejlépe očistila od zbylého tkaniva a nastříhala na kousky o délce asi 4 mm. Dle aktuálně prováděného experimentu byla ponechána či opatrně odstraněna endotelová vrstva.

Jednotlivé aortální kroužky se upevnily na háček. Ten byl přivázan na nitce k převodníku zachycující cévní pohyb za převodu mechanické energie v elektrický signál. Prostřednictvím převodníku se signál zobrazoval pomocí vyhodnocovacího softwaru S.P.E.L. Advanced Kymograph Software. Háčky se vzorky byly upevněny na nosiči a ponořeny do lázně Krebsova roztoku (5 ml) sloužícího jako živné médium. Roztok byl neustále temperován na teplotu 37 °C a okysličován pneumoxidem. Kroužky tkáně byly napnuty na úvodní zátěž 2 g a po dobu 45 minut byly ponechány stabilizovat. Po tuto dobu byl každých 10 minut vyměněn živný Krebsův roztok za nový tak, aby byly kroužky zcela ponořeny.

Před každým zahájením experimentu bylo třeba otestovat kontraktilitu cévy a funkčnost endotelu. Nejdříve se navodila kontrakce přidáním noradrenalinu (finální koncentrace v lázni 1 μM). Po ustálení kontrakce se pokračovalo ověřením neporušenosti endotelové vrstvy. Do lázně se přidal acetylcholin (finální koncentrace 100 μM) a známkou neporušeného endotelu byla vasodilatace cévy. Lázeň se následně několikrát promyla Krebsovým roztokem a doplnila na objem 5 ml. Po ustálení hodnot následoval vlastní experiment.

5.2.2. Vlastní experiment

5.2.2.1. Testování vasodilatačního účinku

Pro zjištění, zda vzorek vykazuje vasodilatační účinky, bylo třeba cévu opět prekontrahovat. Do komory s lázni se proto přidal NA (finální koncentrace 10 μM).

Po ustálení vasokonstrikční odpovědi byla přidávána testovaná látka. Připravené roztoky BPAF se podávaly kumulativně dle rostoucí koncentrace. Nová dávka byla vždy podána po ustálení hodnot předchozí dávky. Testovány byly finální koncentrace v lázni 100 nM až 100 μ M. Po celou dobu pokusu vždy jeden ze čtyř testovaných vzorků sloužil jako kontrola. Do kontrolní komory byl přidáván DMSO o stejném množství a koncentraci jako roztok testované látky. Závěrem experimentu bylo přidání nitroprusidu sodného o finální koncentraci 10 μ M, který navodil maximální relaxaci cévy.

5.2.2.2. Testování mechanismu účinku

Vliv endotelu, M receptorů, NO syntázy, kalcium řízených draselných kanálů

Testování mechanismu účinku probíhalo obdobným způsobem. V případě testování vlivu endotelu byl před zahájením experimentu z některých cév opatrně odstraněn endotel. V případě blokování testovaného mechanismu antagonistou se postupovalo pro zahájení vlastního experimentu následovně. Do komory s živným roztokem byl přidán antagonist a dvacet minut probíhala inkubace. V případě testování M receptorů byl podán atropin (finální koncentrace 50 μ M). Obdobně při testování vlivu NO syntázy byl přidán L-NAME (finální koncentrace 100 μ M). Testování vlivu kalcium řízených draselných kanálů $K_{Ca2.3}$ a $K_{Ca3.1}$ probíhalo přidáním TRAM-34 (finální koncentrace 10 μ M) anebo UCL-1684 (finální koncentrace 1 μ M). Část vzorků byla inkubována pouze s rozpouštědlem bez antagonisty jako pozitivní kontrola. Inkubace byla ukončena podáním BPAF v koncentraci navozující 80% relaxaci (finální koncentrace 100 μ M). Experiment byl ukončen navozením maximální relaxace podáním nitroprusidu sodného o finální koncentraci 10 μ M.

Vliv napětově řízených vápenatých kanálů

Na začátku vlastního pokusu byl na podporu kontrakce do Krebsova roztoku přidán KCl (koncentrace v lázni 15 mM). Po ustálení reakce byl do lázně přidán BPAF v dávce vyvolávající 80% nebo 20% relaxaci v 1% roztoku DMSO. Inkubace trvala 20 minut. Následně byl pro postupné navození kontrakce kumulativně přidáván BayK-8644, a to ve finální koncentraci od 1 nM do 10 μ M. Jako pozitivní kontrola byl u několika vzorků místo BPAF použit nifedipin (150 nM v 1% DMSO). Negativní kontrolou byl 1% roztok DMSO. Na závěr pokusu byla navozena maximální kontrakce pomocí KCl (finální koncentrace 60 mM).

5.2.3. Vyhodnocení

Zaznamenané údaje a výsledky byly zpracovány a vyhodnoceny počítačovým programem Excel a GraphPad Prism.

Vasodilatační účinek BPAF

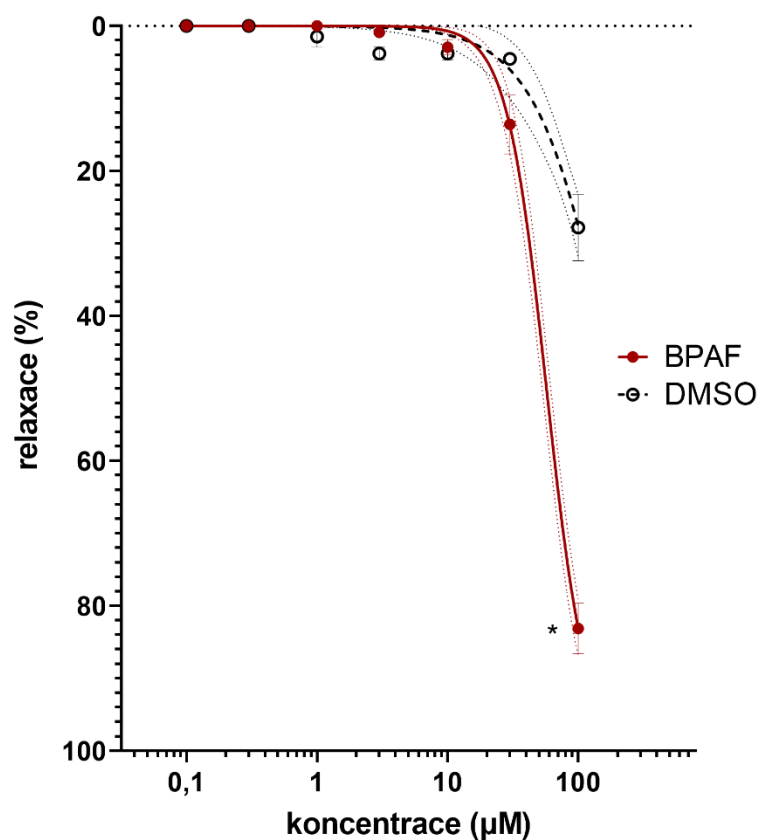
Nejprve byly přepočteny hodnoty navozené relaxace po každé dávce BPAF na procenta z maximální relaxace cévy. Následně byly údaje vneseny do grafu závislosti relaxace cévy na koncentraci BPAF (obr. 12). Z křivky byla odečtena hodnota EC₅₀ (koncentrace látky navozující 50% relaxaci z maximální možné relaxace) a byl stanoven konfidenční interval 95 % (tab. 7). Účinek jednotlivých dávek BPAF byl porovnán s kontrolou (DMSO) pomocí testu Two-way ANOVA.

Mechanismus účinku BPAF

Z experimentů zkoumajících mechanismus účinku za použití antagonistů nebo odstranění endotelu jsme dosaženou relaxaci opět přepočtli na procento z maximální možné relaxace a získané hodnoty zanesli do grafu (obr. 13). Poté jsme srovnali relaxaci navozenou při blokádě daného receptoru / odstranění endotelu s relaxací navozenou bez použití antagonisty / za přítomnosti endotelu. Ke srovnání byl použit nepárový t-test.

Hodnoty získané z pokusu na vliv napěťově řízených vápenatých kanálů byly nejdříve přepočteny na procenta maximální kontrakce cévy a zaneseny do grafu závislosti kontrakce cévy na koncentraci BayK-6844 (obr. 14). Ke srovnání proti negativní kontrole (DMSO) byl použit test Two-way ANOVA.

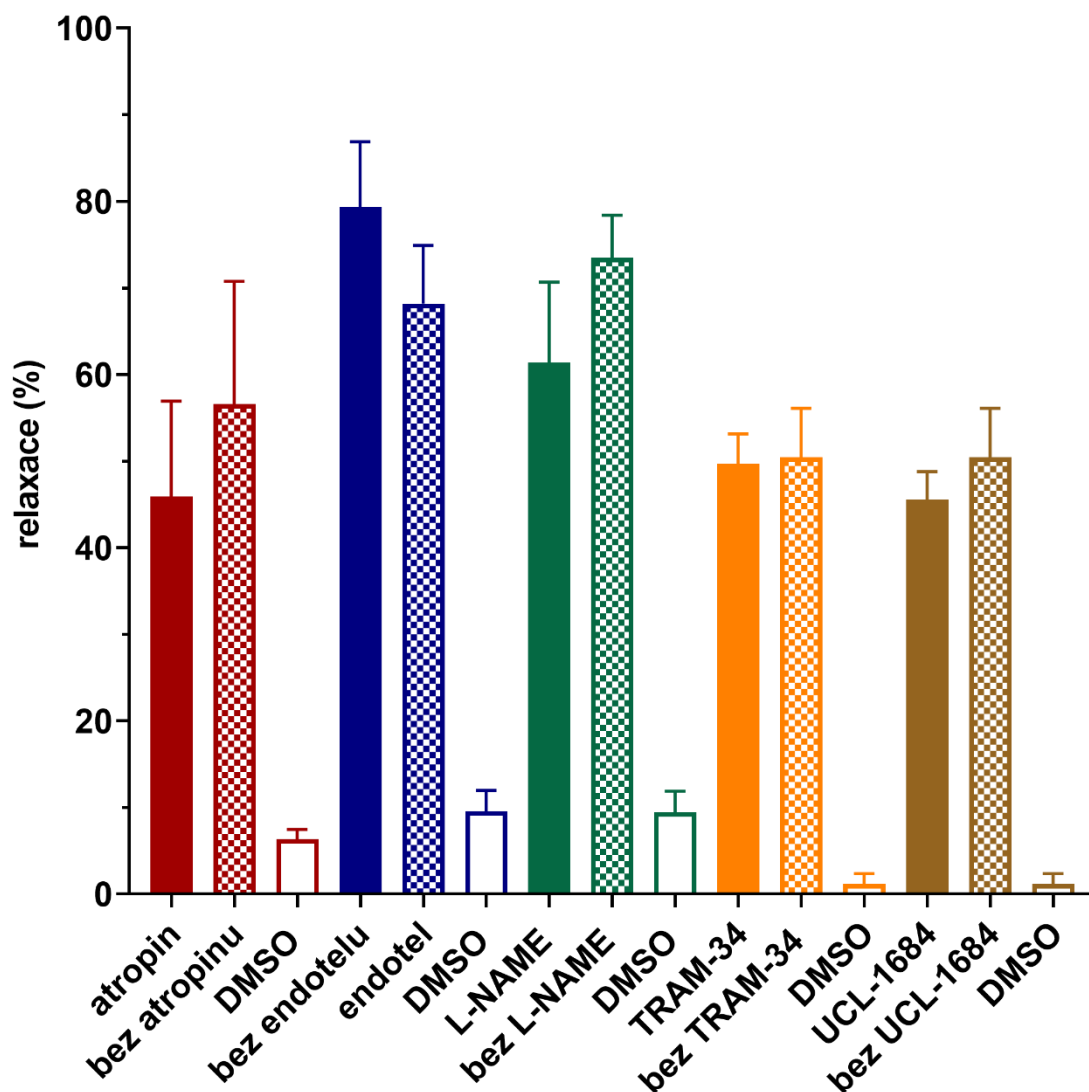
6. Výsledky



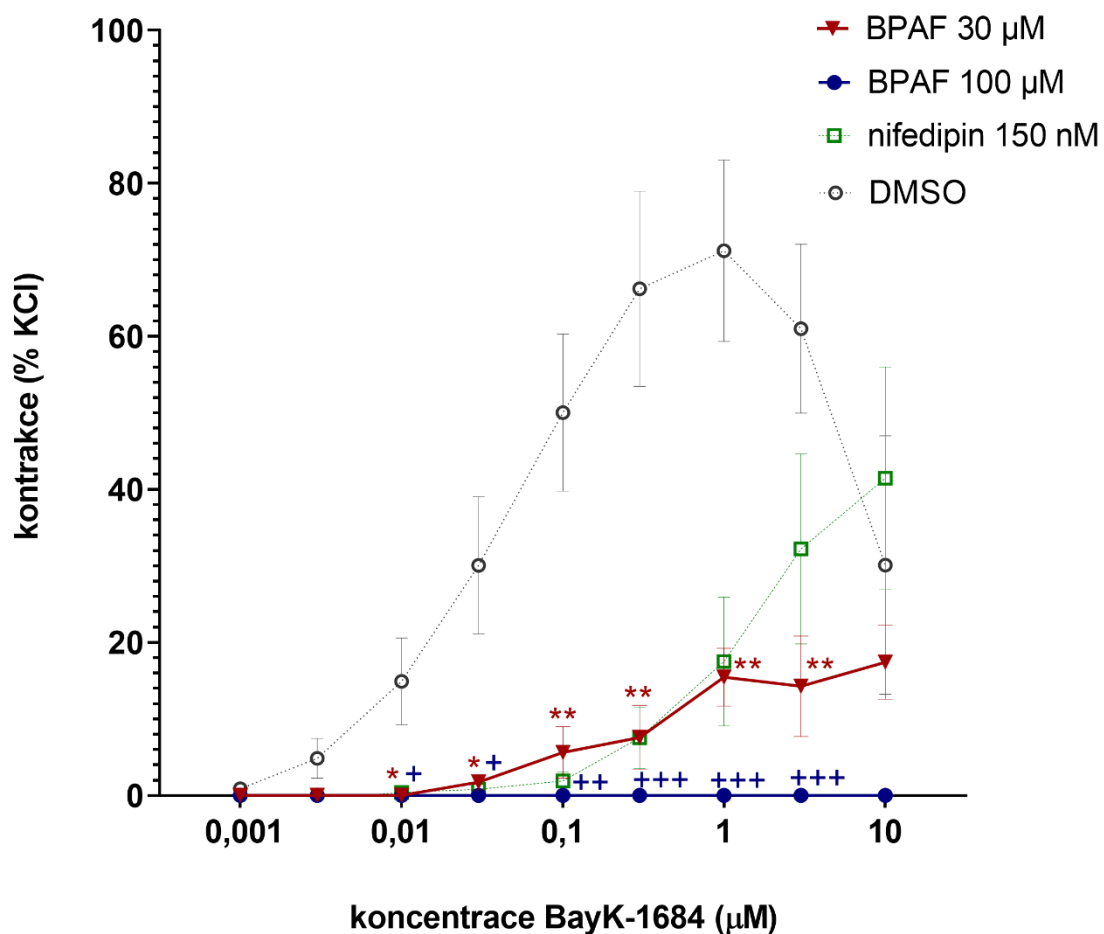
Obr. 12: Relaxace cévy bisfenolem AF. Vasodilatační účinky BPAF byly zkoumány na intaktních kroužcích aorty potkana prekontrahovaných noradrenalinem (10 μM) za kumulativního přidávání testované látky v koncentraci od 100 nM do 100 μM . Z křivky je zřejmé, že bisfenol AF vykazuje vasorelaxační účinek v závislosti na podané koncentraci. V nejvyšší podané koncentraci navodil přes 80 % z maximální možné relaxace. Účinek byl porovnán s kontrolou (DMSO). Hodnoty jsou vyjádřeny $\pm\text{SEM}$ a s 95% konfidenčním intervalem. * $p < 0,05$ BPAF vs DMSO.

Tab. 8: Hodnoty EC_{50} a konfidenčního intervalu bisfenolu AF a DMSO

	EC_{50} (μM)	$\text{CI}_{95\%}$
BPAF	57,16	53,01 - 61,64
DMSO	191,90	136,50 - 327,40



Obr. 13: Mechanismus účinku BPAF. Vasorelaxační účinky *ex vivo* jedné dávky BPAF (100 μ M) byly sledované na intaktních kroužcích aorty potkana prekontrahovaných noradrenalinem (10 μ M) za přítomnosti antagonisty M-receptorů atropinu (50 μ M) nebo inhibitoru NO-syntázy L-NAME (100 μ M) anebo inhibitorů Ca^{2+} -aktivovaných K^+ kanálů TRAM-34 (10 μ M) a UCL-1684 (1 μ M). V jedné skupině pokusů byly sledovány aortální kroužky bez endotelu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procento z maximální relaxace navozené nitroprusidem sodným (10 μ M) \pm SEM. Nebyly zjištěny signifikantní změny.



Obr. 14: Účast L-typu kalciových kanálů na účinku BPAF. V pokuse *ex vivo* na kroužcích aorty potkana zbavené endotelu bylo sledováno zablokování účinku BayK-8644 a jím navozené aktivace L-typu kalciových kanálů pomocí předchozí inkubace s BPAF ve dvou různých koncentracích (30 μM or 100 μM). Jako pozitivní a negativní kontrola byly použity nifedipin (150 nM) a 1% DMSO. Podle použité koncentrace BPAF dokázal omezit nebo zcela zabránit vasokonstrikci. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procento z maximální kontrakce navozené KCl (60 mM) ±SEM. * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$ pro koncentraci 30 μM BPAF vs DMSO a + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ a +++ $p < 0,001$ pro koncentraci 100 μM BPAF vs DMSO. Signifikantní rozdíly byly nalezeny u obou použitých koncentrací BPAF, koncentrace 100 μM kontrakci zcela zablokovala.

7. Diskuze

Výzkumná skupina kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie se dlouhodobě zabývá kardiovaskulárními účinky polyfenolických látek. Tato diplomová práce byla vypracována v rámci testování působení bisfenolů a je součástí širšího výzkumu.

Bisfenoly jsou organické sloučeniny využívané zejména pro výrobu plastů a pryskyřic. Do kontaktu s nimi mohou lidé přicházet formou potravinových obalů, plechovek, laků, barev, knih a novin, brýlových čoček, hraček i zdravotních prostředků (Maćczak et al. 2015). Jejich působení na lidský organismus je spojováno s řadou nežádoucích účinků. Bisfenoly jsou považovány za endokrinní disruptory. Zasahují do působení některých hormonů, jako jsou hormony štítné žlázy, glukokortikoidy a pohlavní hormony. V těle se vážou na receptory pro estrogen a napodobují tak působení estrogenu. Nepříznivé účinky se projevují i na úrovni metabolismu (diabetes mellitus) nebo kognice a učení, což se jeví jako rizikové zejména pro vývoj dětí. V neposlední řadě jsou reprotoxické a způsobují změny krevních složek (Lucarini et al. 2020, Maćczak et al. 2015, Thoene et al. 2018). Popisovány jsou také nepříznivé interakce bisfenolů s kardiovaskulárním systémem. Existuje podezření z kardiotoxicity a z účasti na rozvoji mnohých kardiovaskulárních chorob (Gao a Wang 2014). Některé studie uvádějí pozitivní účinek na relaxaci hladkého cévního svalu (Feiteiro et al. 2018). Na druhou stranu existují studie na zvířatech, které popisují endotelovou dysfunkci a dávkově závislý nárůst krevního tlaku (Saura et al. 2014).

Existuje více typů bisfenolů. Nejznámějším a také nejvíce prozkoumaným bisfenolem je bisfenol A. Poznatky o jeho možných nežádoucích účincích vedly k omezení jeho užívání a náhradě jinými látkami včetně dalších typů bisfenolů. Bohužel u ostatních bisfenolů existuje velmi málo údajů ohledně možné toxicity a rizikovosti, údaje o vlivu na kardiovaskulární systém v podstatě chybí. Tato diplomová práce je věnována účinkům bisfenolu AF na cévu. Bisfenol AF byl zvolen na základě předchozího screeningu, který nebyl součástí mé práce, a ve kterém bylo zjištěno, že ze všech testovaných bisfenolů má bisfenol AF nejvyšší vasodilatační schopnosti. Cílem mé práce bylo (1) ověřit úvodní údaje o vasodilatačních schopnostech bisfenolu AF a (2) zkusit zjistit možné mechanismy jeho vasodilatačního působení. Pokusy byly prováděny metodou *ex vivo* na izolované hrudní aortě potkana. Jedná se o klasickou

metodu experimentální farmakologie, která je ve Výzkumné skupině kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie již řadu let používaná a mohla jsem proto převzít zavedené postupy práce. Prvním úkolem bylo zjistit, zda má bisfenol AF vasodilatační účinky. Skutečně jsme potvrdili dávkově závislou vasodilataci ($EC_{50} = 57,16 \mu M$), která byla významně odlišná od kontroly, a v nejvyšší podané dávce $100 \mu M$ bylo navozeno 80 % z maximální možné relaxace.

Protože se bisfenol AF ukázal jako vasodilatačně účinný, následně jsme přistoupili k ověřování možného mechanismu účinku. Bylo testováno více možností, které by za vasodilataci mohly být zodpovědné. Jako první jsme ověřovali, zda se na vasodilataci podílí cévní endotel, což se nepotvrdilo. V souladu s tím jsme následně vyloučili další vasodilatační mechanismy svázané s endotelem: vliv na muskarinové receptory, vliv na NO syntázu a vliv na endotelové kalcium řízené draselné kanály IK_{Ca} a SK_{Ca} . O vlivu bisfenolů na tyto struktury téměř neexistují informace v literatuře. Aktivaci kalcium řízených draselných kanálů po podání bisfenolu A sice prokázal Schinichi Asano et al. (2010), ale jednalo se ale o jiný typ kanálů – o kanály BK_{Ca} v buňkách cévního hladkého svalu. Kromě toho pokusy prováděl na lidských a psích buňkách z koronárních cév, zatímco my jsme pracovali s potkaní aortou.

Posledním testovaným mechanismem byl možný vliv bisfenolu AF na L-typ vápníkových kanálů. Ten se nám podařilo prokázat a potvrdit tento účinek jako dávkově závislý. To je v souladu s publikací J. Feiteiro et al. (2018), kde zjistili, že bisfenol A rovněž blokuje tento typ iontového kanálu v hladkém svalu hrudní aorty potkana a navozuje vasorelaxaci. K pokusu použili techniku patch-clamp, zatímco my jsme stejný mechanismus ověřili pomocí agonisty BayK 8644. Vliv na L-typ vápníkových kanálů nevyklučuje současné působení na kanály BK_{Ca} , které popsal S. Asano et al. (2010). Tuto možnost by bylo vhodné ověřit v dalších pokusech, např. s iberiotoxinem, které již přesahují rozsah této diplomové práce.

Vápníkové kanály L-typu představují zásadní zdroj extracelulárních vápenatých iontů pro vasokonstrikci a jejich zablokování proto působí vasodilatačně. I když je vasodilatace obecně chápána jako prospěšná a vasoprotektivní, správná činnost cévního systému je založena na rovnováze mezi vasodilatačními a vasokonstrikčními ději. Přiměřená vasokonstrikce se podílí na udržení potřebného myogenního tonu a patří do normální vaskulární fyziologie. Dlouhodobá expozice farmakologicky relevantním

dávkám bisfenolů by tuto normální fyziologii mohla narušovat a eventuálně představovat rizikový faktor. K ověření této hypotézy by byly potřeba další pokusy.

Tato diplomová práce je součástí širšího výzkumu Výzkumné skupiny kardiiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie. V pokusech *in vivo* již byly sledovány akutní kardiiovaskulární účinky bisfenolů AF, A, F a S, které ale byly mírné a projevíly se jen jako nevýznamné tendence. V této době probíhají pokusy na ověření cytotoxicity. Je třeba vzít do úvahy, že v reálném životě je expozice bisfenolům dlouhodobá. Bylo by proto zajímavé zaměřit se na jejich účinky po opakovaném dlouhodobém podání.

8. Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vasodilatačními účinky bisfenolu AF a následným zkoumáním mechanismu účinku. Experimenty byly prováděny *ex vivo* na úsecích hrudní aorty potkana kmene Wistar.

Z výsledků experimentů vyplynuly tyto skutečnosti

- Bisfenol AF vykazuje vasorelaxační účinky, a to při podání vyšších dávek (desítky μM). V koncentraci 100 μM navodil 80 % z maximální možné relaxace navozené nitroprusidem sodným ($\text{EC}_{50} = 57,16 \mu\text{M}$). Účinek byl významný vůči kontrole.
- Byl prokázán dávkově závislý mechanismus účinku navozující vasodilataci. Spočívá v blokádě napětově řízených vápenatých kanálů (L typ) Cav1.2. Koncentrace BPAF 30 μM navodila částečnou a koncentrace 100 μM úplnou blokádu těchto kanálů. Účinek byl významný vůči kontrole.
- Testovány byly i další možné mechanismy účinku: vliv endotelu, vliv NO syntázy, účinky na M receptory a na endoteliální kalcium řízené draselné kanály. Účast na vasodilataci nebyla potvrzena u žádného z nich.

9. Literatura

- 1) Ames, Marisa K., Clarke E. Atkins, Bertram Pitt. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2019, 33(2): 363-382. doi: 10.1111/jvim.15454
- 2) Asano, Schinichi, Johnathan D Tune, Gregory M Dick. Bisphenol A activates Maxi-K (KCa1.1) channels in coronary smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 2010,160(1): 160-170. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00687.x
- 3) Betts, J. Gordon et al.. *Anatomy & Physiology*. Houston: Openstax. 2013. ISBN: 978-1-938168-13-0
- 4) Brunton, Laurence L., Bruce Chabner, Bjorn C. Knollmann. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (12th ed.)*. New York: McGraw-Hill Education. 2011. ISBN: 978-0-07-176939-6
- 5) Cyr, Anthony R., Lauren V Huckaby, Sruti S Shiva, Brian S Zuckerbraun. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*. 2020, 36(2): 307-321. doi: 10.1016/j.ccc.2019.12.009
- 6) Čihák, Radomír. *Anatomie 3*. Praha: Grada. 1997. ISBN: 802471132X
- 7) Daniels, Lori B., Alan S. Maisel. Natriuretic peptides. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007, 50(25): 2357-2368. doi: 10.1016/j.jacc.2007.09.021
- 8) Devika, N. T., B. M. Jaffar Ali. Analysing calcium dependent and independent regulation of eNOS in endothelium triggered by extracellular signalling events. *Molecular biosystems*. 2013, 9(11): 2653-2664. doi: 10.1039/c3mb70258h
- 9) Druga, Rastislav, Miloš Grim, Karel Smetana. *Anatomie periferního nervového systému, smyslových orgánů a kůže*. Praha: Galén a Karolinum. 2013. ISBN 978-80-246-2241-5

- 10) Dylevský, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada. 2009. ISBN 978-80-247-3240-4
- 11) Feiteiro, Joana, Melissa Mariana, Solage Glória, Elisa Cairrao. Inhibition of L-type calcium channels by Bisphenol A in rat aorta smooth muscle. *The Journal of toxicological sciences*. 2018, 43(10): 579-586. doi: 10.2131/jts.43.579
- 12) Fišera, Roman, Milan Králik. Katalyzátory na báze organických polymérov, ich výhody a nevýhody, príprava priemyselnej aplikácie. *Chemické listy*. 1997, 91: 421-426
- 13) Ganong, William. *Přehled lékařské fyziologie, 20. vydání*. Praha: Galén. 2005. ISBN 80-7262-311-7
- 14) Gao, Xiaoqian, Hong-Sheng Wang. Impact of Bisphenol A on the Cardiovascular System - Epidemiological and Experimental Evidence and Molecular Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014, 11(8): 8399-8413. doi: 10.3390/ijerph110808399
- 15) Huryra, Martin, Jan Přeček. Plicní arteriální hypertenze- současné možnosti diagnostiky a léčby. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2017, 16(2): 63-68. doi: 10.36290/kar.2017.037
- 16) Cheng, Heping, W.J. Lederer. Calcium Sparks. *Physiological reviews*. 2008, 88(4): 1491-1545. doi: 10.1152/physrev.00030.2007
- 17) Kaschina, Elena, Pawel Namsolleck, Thomas Unger. AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Research*. 2017, 125: 39-47. doi: 10.1016/j.phrs.2017.07.008
- 18) Kittnar, Otomar, a kolektiv. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada. 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- 19) Klener, Pavel et al.. *Vnitřní lékařství*, čtvrté vydání. Praha: Galén a Karolinum. 2012. ISBN 978-80-7262-857-5

- 20) Langmeier, Miloš. *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada. 2009. ISBN 978-80-247-2526-0
- 21) Lincová, Dagmar. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén. 2002. ISBN 80-7262-168-8
- 22) Lucarini, Fiorella, Tropoja Krasniqi, Gaëlle Bailat Rosset et al.. Exposure to New Emerging Bisphenols Among Young Children in Switzerland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020, 17(13): 4793. doi: 10.3390/ijerph17134793
- 23) Maćczak, Aneta, Bożena Bukowska, Jaromir Michałowicz. Comparative study of the effect of BPA and its selected analogues on hemoglobin oxidation, morphological alterations and hemolytic changes in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2015, 176-177: 62-70. doi: 10.1016/j.cbpc.2015.07.008
- 24) Málek, Filip. Duální inhibice receptoru angiotenzinu a neprilysinu – revoluční princip léčby chronického srdečního selhání se sníženou ejekční frakcí levé komory. *Kardiologická revue*. 2015, 18 (4): 281-286.
- 25) Martínek, Jindřich, Zdeněk Vacek. *Histologický atlas*. Praha: Grada. 2009. ISBN: 978-80-247-2393-8
- 26) Martínková, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. 2007. ISBN 978-80-247-1356-4.
- 27) Matouš, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén. 2010. ISBN 978-80-7262-702-8
- 28) Mescher, Anthony L.. *Junqueira's Basic Histology Text & Atlas (15th ed.)*. New York: McGraw-Hill Education. 2018. ISBN 978-1-260-02617-7

- 29) Mikołajewska, Karolina, Joanna Stragierowicz, Jolanta Gromadzińska. Bisphenol A – Application, sources of exposure and potential risks in infants, children and pregnant women. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 2015, 28: 209-241. doi: 10.13075/ijomeh.1896.00343
- 30) Moreau, Marie Eve, Nancy Garbacki, Giuseppe Molinaro, Nancy J Brown, François Marceau, Albert Adam. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *Journal of pharmacological sciences*. 2005, 99(1): 6-38. doi: 10.1254/jphs.srj05001x.
- 31) Naňka, Ondřej, Miloslava Elišková. *Přehled anatomie*. Praha: Galén. 2015. ISBN 978-80-7492-206-0
- 32) Narumiya, Shuh, Yukihiko Sugimoto, Fumitaka Ushikubi. Prostanoid receptors: Structure, properties and functions. *Physiological reviews*. 1999, 79: 1193-1226. doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1193
- 33) Rokyta, Richard a kolektiv. *Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi*. Praha: Grada. 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.
- 34) Saura, Marta, Susana Marquez, Paula Reventun, et al.. Oral administration of bisphenol A induces high blood pressure through angiotensin II/CaMKII-dependent uncoupling of eNOS. *The FASEB Journal*. 2014, 28(11): 4719-4728. doi: 10.1096/fj.14-252460
- 35) Silbernagl, Stefan, Florian Lang. *Atlas patofyziologie, 2. vydání*. Praha: Grada. 2012. ISBN: 80-7169-968-3
- 36) Skledar, Darja Gramec, Lucija Peterlin Mašič. Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2016, 47: 182-199. doi: 10.1016/j.etap.2016.09.014
- 37) Schiffrin, Ernesto L.. Vascular endothelin in hypertension. *Vascular Pharmacology*. 2005, 43: 19-29. doi: 10.1016/j.vph.2005.03.004

- 38) Špác, Jiří. Jak nejlépe blokovat renin-angiotenzinový systém u nemocných s hypertenzí a diabetes mellitus?. *Kardiologická revue*. 2016, 18(1): 13-16.
- 39) Špác, Jiří, Markéta Vyskočilová. Blokátory kalciového kanálu po 50 letech. *Klinická farmakologie a farmacie*. 2018, 32(1): 22-26. doi: 10.36290/far.2018.005
- 40) Špínar, Jindřich, Jiří Vítovec. Blokáda systému renin angiotenzin v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. *Intervenční a akutní kardiologie*. 2010, 9(5): 252-257.
- 41) Štejfa, Miloš. *Kardiologie*. Praha: Grada. 2006. ISBN: 978-80-247-1385-4
- 42) Thoene, Michael, Liliana Rytel, Natalia Nowicka et al.. The state of bisphenol research in the lesser developed countries of the EU. *Toxicology Research*. 2018, 7: 371-380. doi: 10.1039/c8tx00064f
- 43) Trojan, Stanislav et al.. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada. 2003. ISBN: ISBN 80-247-0512-5
- 44) Vajner, Luděk, Jiří Uhlík, Václava Konrádová, Tomáš Novotný. *Lékařská histologie II: Mikroskopická anatomie*. Praha: Karolinum. 2015. ISBN: 9788024621654
- 45) Vandenberg, Laura N., Russ Hauser, Michele Marcus et al.. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology*. 2007, 24: 139-177. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.07.010
- 46) Vítovec, Jiří, Jindřich Špínar, Lenka Špínarová a kolektiv. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*, 3. vydání. Praha: Grada. 2017. ISBN 978-80-247-4713-2

- 47) Wachter, Blake S., Edward M. Gilbert. Beta-Adrenergic Receptors, from Their Discovery and Characterization through Their Manipulation to Beneficial Clinical Application. *Cardiology*. 2012, 122: 104-112. doi: 10.1159/000339271
- 48) Webb, Clinton R.. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education*. 2003, 27(4): 201-206. doi: 10.1152/advan.00025.2003
- 49) Widimský, Jiří et al.. Diagnostické a léčebné postupy u arteriální hypertenze – verze 2017. Doporučené České společnosti pro hypertenzi. *Vnitřní lékařství*. 2017, 64(7-8): 771-796.
- 50) Xia, Ning, Ulrich Förstermann, and Huige Li. Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules*. 2014, 19(10): 16102-16121. doi: 10.3390/molecules191016102
- 51) Yang, Shoufei, et al.. Use of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes to study cardiotoxicity of bisphenol AF via the GPER/CAM/eNOS pathway. *Toxicology*. 2020, 432:152380. doi: 10.1016/j.tox.2020.152380
- 52) Zhao, Yingzi, Paul M. Vanhoutte, Susan W.S. Leung. Vascular nitric oxide: Beyond eNos. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015, 129: 83-94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002

Elektronické zdroje

- 1) Anonym. Bisfenol A. In: *Wikipedia*, 2010. [online] Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Bisfenol_A> [cit. 18.3.2021]
- 2) Blausen.com staff, Medical gallery of Blausen Medical. 2014. In: *WikiJournal of Medicine* 1 (2), 2014. [online] Dostupné z: <<https://en.wikipedia.org/wiki/Artery>> [cit. 9.2.2021]
- 3) Fontana, Josef, a kolektiv. Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta se cvičebnicí. Praha: 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, 2014. [online]. Dostupné z: <<http://fbt.cz/skripta/>> [cit. 5.12.2020]
- 4) a) Klabunde, Richard E.. Endothelin. In: *Cardiovascular Physiology concepts*, 2009. [online] Dostupné z: <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF012#NO_Biosynthesis> [cit. 14.2.2021]
- b) Klabunde, Richard E.. Nitric Oxide. In: *Cardiovascular Physiology concepts*, 2009. [online] Dostupné z: <<https://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF011>> [cit. 15.2.2021]
- c) Klabunde, Richard E.. Arachidonic Acid Metabolites (Prostaglandins and Related Compounds). In: *Cardiovascular Physiology concepts*, 2009. [online] Dostupné z: <<https://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF013>> [cit. 15.2.2021]
- 5) Málek, Filip. Natriuretické peptidy. In: *Remedia*, 2002, 12:146–150. [online] Dostupné z: <<http://www.remédia.cz/Clanky/Aktuality/Natriureticke-peptidy/6-E-fx.magarticle.aspx>> [cit. 5.3.2021]
- 6) a) Mladěnka, Přemysl. Farmakologie cévního (vaskulárního) systému - látky ovlivňující hladký cévní sval. In: *Faf.cuni*, 2018. [online] Dostupné z: <<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/>> [cit. 15.2.2021]
- b) Mladěnka, Přemysl. Autonomní nervový systém. In: *Faf.cuni*, 2018. [online] Dostupné z: <<https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/>> [cit. 7.3.2021]

- 7) Rad, A.. Renin-angiotenzin-aldosteronový systém. In: *Wikiskripta*, 2011. [online]
Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/w/Renin-angiotenzin-aldosteronový_systém> [cit. 23.3.2021]