

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**ÚČINKY VYBRANÝCH LÁTEK IN VITRO NA IZOLOVANÉ AORTĚ
POTKANA**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2018

Anna Beránková

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

V Hradci Králové dne

Podpis

Děkuji své vedoucí diplomové práce PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a všestrannou pomoc s vypracováním diplomové práce. Stejně tak děkuji i ostatním členům výzkumné skupiny Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie, kteří se podíleli na provedení experimentální části této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Anna Beránková

Školitel: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název diplomové práce: Účinky vybraných látek *in vitro* na izolované aortě potkana

Flavonoidy jsou početnou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů. Flavonoidní sloučeniny jsou látky široce zastoupené v přírodě a řada z nich má příznivý vliv na organismus, především pro své vasodilatační, antioxidační a protizánětlivé účinky. Pro tuto diplomovou práci byly vybrány tři látky: dvě látky ze skupiny isoflavonoidů, genistin a genistein, a koncový produkt metabolismu genisteinu, 4-etylfenol. Cílem práce je výzkum vasorelaxačních účinků těchto látek v *in vitro* podmínkách.

Vasorelaxační potenciál zkoušených látek byl ověřen *in vitro* na izolovaných aortálních kroužcích potkana Wistar. Byl měřen účinek vzrůstajících dávek jednotlivých látek na prekontrahované aortální kroužky s intaktním endotelem.

Z naměřených hodnot napětí cévy byly sestaveny DRC křivky a stanoveny hodnoty EC_{50} . Výsledky byly vyhodnoceny. Z analýzy výsledků vyplývá, že nejvyšší aktivitu měl genistein ($EC_{50} 2,903 \cdot 10^{-5} \text{ M}$). Částečnou vasorelaxaci vyvolal i genistin ($EC_{50} 4,045 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) a vysoké dávky 4-etylfenolu ($EC_{50} 1,509 \cdot 10^{-3} \text{ M}$).

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Anna Beránková
Supervisor: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.
Title of diploma thesis: The *in vitro* effects of selected substances on isolated rat aorta

Flavonoids are a numerous group of secondary plant metabolites. Flavonoid compounds are substances widely extended in nature and many of them have a positive influence on human health, primarily for their vasodilatory, antioxidant and anti-inflammatory effects. Three substances were selected for this diploma theses: two substances of isoflavonoid group, genistin and genistein, and the end product of genistein metabolism, 4-ethylphenol. The aim of this work is examination of vasorelaxant effects of this substances *in vitro*.

Vasorelaxing potential of tested substances was tested *in vitro* in isolated aortic rings of Wistar rat. The effect of increasing doses of individual substances in precontracted aortic rings with intact endothelium was measured.

From the obtained values of vessel tension, the DRC curves and EC_{50} values were created. The results were evaluated. The results analysis shows, that genistein ($EC_{50} 2,903 \cdot 10^{-5}$ M) had the most significant activity. Also genistin ($EC_{50} 4,045 \cdot 10^{-4}$ M) and high doses of 4-ethylphenol ($EC_{50} 1,509 \cdot 10^{-3}$ M) caused a partial vasorelaxation.

Obsah

1	Seznam zkratek	8
2	Úvod.....	9
3	Teoretická část	10
3.1	Krevní cévy	10
3.2	Obecná stavba cév	10
3.2.1	Tunica intima	11
3.2.2	Tunica media.....	12
3.2.3	Tunica adventitia.....	12
3.2.4	Výživa cévní stěny.....	12
3.2.5	Inervace cévní stěny.....	13
3.3	Specifická stavba cév	13
3.3.1	Arterie	13
3.3.1.1	Arterie elastického typu.....	13
3.3.1.2	Arterie svalového typu	14
3.3.2	Vény.....	14
3.3.3	Kapiláry	14
3.4	Hladký cévní sval.....	15
3.4.1	Stavba hladkého svalu	15
3.4.2	Kontrakce hladkého svalu.....	16
3.5	Regulace vasokonstrikce a vasodilatace	17
3.5.1	Místní regulační mechanismy	17
3.5.1.1	Metabolická regulace.....	18
3.5.1.2	Myogenní autoregulace	18
3.5.2	Centrální regulační mechanismy	18
3.5.2.1	Nervové mechanismy	19
3.5.2.2	Hormonální mechanismy.....	19
3.5.2.3	Endotelová regulace	20
3.6	Isoflavonoidy.....	21
3.6.1	Genistein	22
3.6.2	Genistin.....	24

3.6.3	4-etylfenol	25
4	Cíl práce	26
5	Experimentální část	27
5.1	Zvířata a materiál	27
5.1.1	Pokusná zvířata	27
5.1.2	Použité chemikálie	27
5.1.3	Přístroje a pomůcky	28
5.1.4	Testované látky	29
5.2	Metodika	29
5.2.1	Průběh experimentu	29
5.2.1.1	Izolace a příprava tkáně	29
5.2.1.2	Vlastní experiment	30
5.2.2	Vyhodnocení	31
6	Výsledky	32
7	Diskuze	34
8	Závěr	38
9	Literatura	39

1 Seznam zkratk

cAMP – cyklický adenosinmonofosfát

cGMP – cyklický guanosinmonofosfát

DMSO – dimetylsulfoxid

DRC – křivka dávka-účinek

EC₅₀ – koncentrace navozující 50% efekt

EDHF – hyperpolarizační faktor odvozený od endotelu

NA – noradrenalin

PGI₂ – prostaglandin I₂

2 Úvod

Kardiovaskulární systém představuje důležitou orgánovou soustavu lidského těla. Jeho hlavním úkolem je zajištění dodávky kyslíku a živin k jednotlivým tkáním a orgánům, odvod metabolitů a toxických látek z těchto tkání pryč a transport hormonů a obranných látek. Základními složkami tohoto systému jsou srdce a cévy. (Čihák, 2004)

Hlavním regulačním mechanismem cév je hladký cévní sval, jehož prostřednictvím může céva měnit svůj průsvit a regulovat tak přívod krve k jednotlivým tkáním a ovlivňovat výšku krevního tlaku. (Langmeier 2009)

Látky schopné ovlivnit kontrakci a relaxaci hladkého cévního svalu dělíme na vasokonstrikční a vasodilatační. Uplatnění těchto vasoaktivních látek ve farmakoterapii je značné (Katzung 2006), proto se na jejich výzkum zaměřuje i předkládaná práce.

Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů polyfenolického typu. Jsou hojně rozšířeny v rostlinné říši, bylo popsáno více než 4000 látek. Mezi hlavní zdroje flavonoidů v lidské stravě patří zelenina, semena, citrusy, olivový olej, čaj a červené víno. (Middleton et al. 2000)

Účinky flavonoidů na lidský organismus jsou široké a zahrnují schopnost normalizovat vlastnosti kapilární stěny a působit antihemoragicky a antiedematózně. Některé snižují krevní tlak, působí antiagregačně. Flavonoidy mají antioxidantní účinky, jsou schopné eliminovat volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku při jejich nadprodukci. (Spilková 2016) Podávání potravy bohaté na flavonoidy může pozitivně ovlivnit funkci endotelu a podpořit relaxaci cév. (Tanwar a Mogdil 2012) Právě na tyto vasorelaxační účinky se zaměřuje předkládaná práce.

Pro výzkum vasoaktivních účinků vybraných flavonoidů a jejich metabolitů byla zvolena standardizovaná metoda izolované aorty.

3 Teoretická část

3.1 Krevní cévy

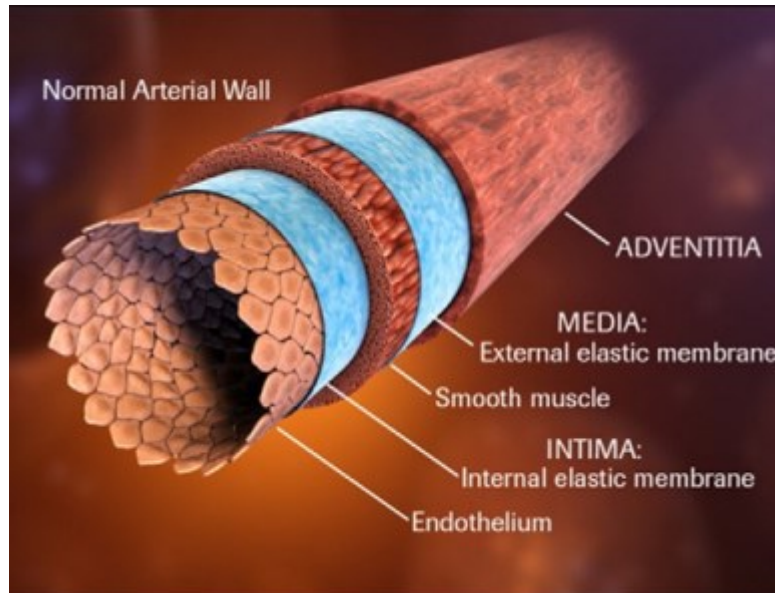
K základním stavebně charakteristickým úsekům cévního řečiště patří tepny – arterie, které se postupně větví a tenčí až do tepének – arteriol. Ty přecházejí ve vlásečnice - kapiláry. Odsud pokračují jako žilky – venuly, které se sbíhají do silnějších žil – vén. (Čihák 2004) Arterioly, kapiláry a venuly tvoří terminální řečiště neboli mikrocirkulaci a vzhledem ke svému hojnému zastoupení představují největší složku celkové plochy průřezu cévního řečiště. (Lüllmann-Rauch 2012) Funkčním nárokům těchto jednotlivých úseků odpovídá struktura cévní stěny.

3.2 Obecná stavba cév

Nejdůležitější histologické součásti cévní stěny jsou:

- endotel – Jednoduchá vrstva plochých buněk. Vystýlá cévy a tvoří bariéru mezi intra- a extravaskulárním prostorem. Tvoří semipermeabilní vrstvu, která propouští živiny a chemické signální molekuly z krve do buněk cévní stěny. (Fortier et al 2014)
- hladká svalovina – Zodpovídá za napětí cévní stěny, regulaci jejího průsvitu a za tvorbu mezibuněčné matrix.
- mezibuněčná hmota – Je složena z kolagenních a elastických vláken a proteoglykanů, podílí se na mechanických vlastnostech cévy. (Lüllmann-Rauch 2012)

Stěna většiny cév je tvořena třemi vrstvami, které nazýváme tunica intima, tunica media a tunica adventitia. (Thomas a Sumam 2016) Na rozhraní mezi tunica intima a tunica media se mohou nacházet elastické blanky zvané membrana elastica interna. Obdobně mezi tunica media a tunica adventitia nalezneme membrana elastica externa. (viz Obr. 1) (Čihák 2004)



Obr. 1 Jednotlivé vrstvy cévní stěny. (Fortier et al. 2014)

Kapiláry toto rozdělení na tři vrstvy s ostatními cévami nesdílí, jsou tvořeny pouze endotelem, bazální laminou a ojedinělými pericyty. (Lüllmann-Rauch 2012)

3.2.1 Tunica intima

Je tvořena jednou vrstvou endotelových buněk, které vystylají vnitřní povrch cévy, a subendotelovou vrstvou. (Hudák a Kachlík 2013)

Buňky endotelu jsou polygonální, ploché. Spočívají na bazální lamině. Obvykle jsou protaženy ve směru toku krve. Centrální oblast buňky, ve které je uloženo ploché jádro, je vyklenutá do lumina cévy. V okolí jádra se nachází Golgiho aparát, mitochondrie, málo četné ribozomy a ojedinělé cisterny granulárního endoplazmatického retikula. Endotelové buňky patří mezi dlouhožijící elementy. (Fortier et al 2014, Konrádová et al. 2000) Mezi buňkami endotelu jsou vytvořeny zonulae adherentes, tight junctions a gap junctions, které brání kontaktu krve s mezibuněčnou hmotou. (Lüllmann-Rauch 2012)

Povrch endotelu je pokryt až 500 nm silnou vrstvou glykokalyx, která činí endotel nesmáčivým a umožňuje vazbu a lokální koncentraci řady molekul, jako jsou protisrážlivé a růstové faktory, cytokiny, chemokiny a enzymy. (Lüllmann-Rauch 2012)

Endotelové buňky vykazují antitrombogenní účinek. Brání styku krevních destiček se subendotelovou vrstvou a jejich shlukování, čímž brání vzniku trombů. Buňky endotelu mají též vlastní metabolickou aktivitu. (Hudák a Kachlík 2013)

Subendotelová vrstva je v dětství slabá a tvořená téměř výhradně mezibuněčnou hmotou bez buněk. Ve vyšším věku se stává silnější a objevují se buňky hladké svaloviny, které do subendotelové vrstvy pravděpodobně migrovaly z tunica media. Jejich hlavní úlohou je produkce mezibuněčné matrix a proliferace, která vede ke ztlušťování intimy se stoupajícím věkem. Subendotelová vrstva je lokací možného rozvoje aterosklerotických změn. (Lüllmann-Rauch 2012)

3.2.2 Tunica media

Tunica media je nejsilnější vrstvou cévní stěny. Je tvořena kruhovitě nebo spirálovitě uspořádanými buňkami hladké svaloviny. Buňky hladké svaloviny produkují mezibuněčnou hmotu. Tvoří ji především glykosaminoglykan, chondroitinsulfát a proteoglykany. Kolem svalových buněk jsou uspořádány sítě kolagenních a elastických vláken, případně elastických blanek. Blanky jsou fenestrované, tato fenestrace dovozuje průnik živin do hlubších partií cév. Arterie svalového typu mají oproti arteriím elastického typu tunica media silnější, což jim umožňuje regulovat průsvit cévy a krevní zásobení příslušné oblasti. (Čihák 2004, Vajner et al. 2018)

3.2.3 Tunica adventitia

= tunica externa.

Je povrchovou vrstvou cévy. Je tvořena fibrilárním vazivem s vlákny kolagenu I a elastickými vlákny, která se na povrchu cévy kříží a přecházejí do okolního vaziva. Tímto způsobem je céva pružně fixována ve svém okolí. (Fortier et al. 2014, Čihák 2004)

3.2.4 Výživa cévní stěny

Výživa drobných cév je zajišťována difuzí kyslíku a živin z krve protékající v lumen cévy. Cévy s průměrem větším než 1 mm mají vlastní systém arteriol a venul, které slouží k výživě cévy, tzv. vasa vasorum.

Vasa vasorum mohou vznikat jako větve arterie, kterou vyživují, nebo jako větve okolních arterií. Vasa vasorum se bohatě větví v adventicii, v menší míře také ve vnějších vrstvách medie. Vyskytují se častěji v žilách než v tepnách, což je dáno nižší koncentrací kyslíku a živin v žilách. (Konrádová et al. 2000)

3.2.5 Inervace cévní stěny

Cévní stěna je inervována autonomním nervovým systémem. Nejbohatší je inervace medie a jejích svalových vláken. Sympatická vlákna vyvolávají vasokonstrikci, parasympatická vasodilataci. V cévách jsou na řadě míst nervové receptory, především tlakové. (Čihák 2004) Inervace arterií je bohatší než inervace vén. (Lüllmann-Rauch 2012)

3.3 Specifická stavba cév

3.3.1 Arterie

Obecně se rozlišují dva základní typy arterií:

- arterie elastického typu
- arterie svalového typu

3.3.1.1 Arterie elastického typu

Představují je arterie velkého kalibru. (Konrádová et al. 2000) Mezi tento typ arterií patří aorta, začátky jejich hlavních větví, plicnice (truncus pulmonalis) a její větve. (Martínek a Vacek 2009)

Nejsilnější vrstvou cévní stěny je tunica media, v níž převažují fenestrované elastické membrány, u menších arterií elastického typu alespoň lamelovitě uspořádaná elastická vlákna. Mezi membránami a skrz fenestrace probíhají retikulární a kolagenní vlákna a kruhovitě uspořádané buňky hladkého svalu cévního. (Martínek a Vacek 2009) Elastických membrán bývá na průřezu až 50, proto se u elastických arterií membrana elastica interna a externa nerozlišuje. (Lüllmann-Rauch 2012)

Tunica adventitia je bohatá na vasa vasorum, které zasahuje až do vnější poloviny tunica media. (Lüllmann-Rauch 2012)

Při výstupu aorty i plicnice ze srdce se na stavbě medie podílejí i kardiomyocyty. (Martínek a Vacek 2009)

3.3.1.2 Arterie svalového typu

Zahrnují zbylé arterie. Jsou vystlány endotelem, nasedajícím na bazální membránu. Subendotelová vrstva je tvořena kolagenním vazivem s podílem myofibroblastů.

Médii tvoří téměř kompaktní vrstva kruhovitě uspořádané hladké svaloviny. Membrana elastica interna je zvlněná, fenestrovaná a zřetelně odlišitelná od ostatních vrstev cévní stěny. Membrana elastica externa nebývá kompaktní, tvoří ji elastická vlákna a lamely. (Martínek a Vacek 2009)

Nejmenšími arteriemi svalového typu jsou arterioly. I pro ně platí přítomnost membrana elastica interna a alespoň jedné vrstvy hladkosvalových buněk v médii. (Martínek a Vacek 2009)

3.3.2 Vény

Žilní stěna je zpravidla tenčí než stěna odpovídajících tepen a je méně zřetelně členěna na vrstvy.

Tunica intima je podobná jako u tepen, membrana elastica interna je často nesouvislá. Některé žíly, především na končetinách, obsahují žilní chlopně. Jedná se o zdvojení intimy v podobě dvou poloměsíčitých chlopní uložených naproti sobě. Chlopně umožňují tok krve směrem k srdci a brání jejímu zpětnému toku. (Lüllmann-Rauch 2012)

Stavba medie vykazuje rozdíly mezi různými typy žil. U končetinových žil je silnější než u žil trupu. U břišních a krčních žil je slabá a obsahuje jen malé množství svalových buněk. Většina žil obsahuje více longitudinálně orientované svaloviny než cirkulární svaloviny. (Lüllmann-Rauch 2012)

Tunica adventitia je silnější než u příslušných tepen a může obsahovat longitudinálně probíhající snopce hladkého svalstva. (Martínek a Vacek 2009)

3.3.3 Kapiláry

Kapiláry jsou nejužší cévy se středním průměrem 7 μm , což odpovídá velikosti jedné červené krvinky. Jejich stěnu tvoří jedna vrstva endotelových buněk, nasedajících na bazální laminu, k níž zvenčí přiléhá síť retikulárních vláken. Často na kapiláru zvenčí přiléhají pericyty, buňky s dlouhými výběžky, kterými cévu obklopují. (Čihák 2004, Lüllmann-Rauch 2012)

Průsvit kapilár se v různých orgánech mění. Většina kapilár má průměr 7 μm , některé kapiláry jsou ještě tenčí, např. v oku a ve svalech (5 - 7 μm). (Čihák 2004) Při průchodu těmito kapilárami se musí krvinka dočasně zdeformovat. (Lüllmann-Rauch 2012)

Široké kapiláry se nazývají sinusoidy. V některých místech měří až 30 – 40 μm . Nacházíme je v játrech, kostní dřeni, zubní dřeni a v kůře nadledvin. (Konrádová et al. 2000, Čihák 2004) V řadě z nich mají endotelové buňky schopnost fagocytózy. (Čihák 2004)

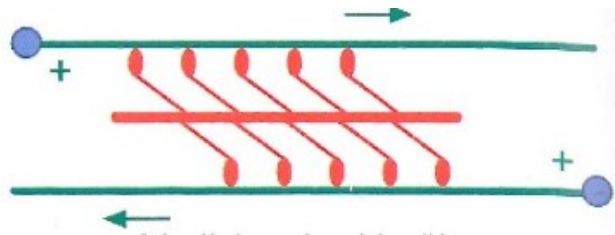
3.4 Hladký cévní sval

Hladký sval je jedním ze tří typů svaloviny, které se vyskytují v lidském těle. Nachází se především ve svalových vrstvách dutých orgánů, které mohou za pomoci těchto svalů měnit svůj průsvit – v cévách, trávicím, dýchacím a močopohlavním systému, ale také v oční duhovce. V závislosti na typu orgánu vytváří pruhy, vrstvy nebo protiběžné systémy. Hladké svalstvo je neovlivnitelné vůlí, jeho kontrakci reguluje autonomní nervový systém, hormonální stimuly a lokální tkáňové faktory. (Lüllmann-Rauch 2012)

3.4.1 Stavba hladkého svalu

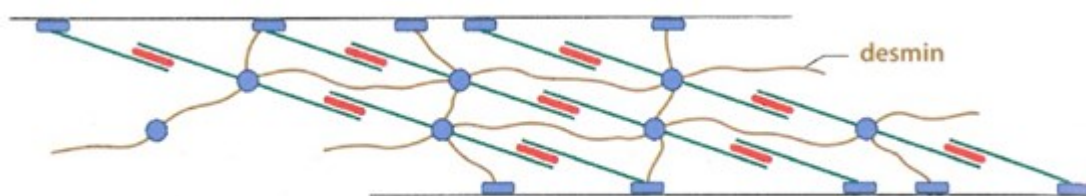
Hladký sval je složen z jednotlivých svalových buněk. Hladkosvalové buňky mají vřetenovitý tvar, v jejich nejširší centrální části je uloženo protáhlé jádro. Buňky dosahují rozměrů od 20 μm (v malých krevních cévách) do 500 μm v těhotné děloze. Buňky jsou obklopeny bazální laminou a sítí retikulárních vláken, které slouží k rovnoměrnému rozložení sil při kontrakci svalu a umožňují harmonizaci stahu. (Junquiera et al. 1997)

Plasmatická membrána hladkosvalové buňky se nazývá sarkolema. Kontraktilní systém je tvořen svazky myofilament, konkrétně tenkými filamenti tvořenými aktinem a tropomyosinem a tlustými filamenti tvořenými myosinem. Myosin se k aktinu váže globulárními hlavičkami, které jsou přítomny po celé délce vlákna a na koncích chybí. (viz Obr. 2) Myofilamenta se na povrchu buňky kříží a vytvářejí mřížovitou strukturu. (viz Obr. 3) (Junquiera et al. 1997)



Obr. 2 Uspořádání aktinu (zelený) a myosinu (červený) v buňce hladkého svalu.
(Převzato z: Lüllmann-Rauch 2012)

Cytoskelet hladkosvalové buňky tvoří síť intermediárních filament, tvořených desminem a v cévním svalu také vimentinem, a nesvalový aktin. (Lüllmann-Rauch 2012) Tenká a intermediární filamenta se upínají k vnitřní straně sarkolemy denzními tělísky. (viz Obr. 3) (Junquiera et al. 1997)



Obr. 3 Schéma kontraktálního aparátu hladkosvalové buňky: aktin (zelený), myosin (červený) a desmin (hnědý). Aktin a desmin se upínají k vnitřní straně sarkolemy denzními tělísky (modrá). (Převzato z: Lüllmann-Rauch 2012)

Z dalších organel se v hladkosvalové buňce v blízkosti jádra vyskytují mitochondrie, Golgiho aparát, drsné endoplazmatické retikulum a volné ribosomy. Sarkoplazmatické retikulum je redukováno. (Junquiera et al. 1997)

Buňka produkuje kolagen, elastin a proteoglykany. (Junquiera et al. 1997)

3.4.2 Kontrakce hladkého svalu

Stah hladkého svalu je založen na reakci aktinu s myosinem. Je zahájen vylitím Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula. Ca^{2+} přestupuje do buňky napětově řízenými kalciovými kanály a uvnitř buňky tvoří komplex s kalmodulinem. Tento komplex aktivuje lehkoreťezcovou myosinkinázu, která je zodpovědná za fosforylaci lehkého řetězce myosinu. Fosforylaci je umožněn vznik aktinomyosinového komplexu. (Junquiera et al. 1997)

Hladké svaly můžeme podle jejich inervace a přenosu elektrického signálu rozdělit na jednotový a vícejednotkový hladký sval. Jednotkové svaly se vyznačují

přítomností spojuj jednotlivých buněk (gap junction), které umožňují elektrickou vazbu buněčných membrán, šíření depolarizace mezi buňkami a tím přenos signálu. (Trojan 1999) Tento typ hladkosvalových buněk se vyskytuje především v dutých orgánech. Vícejednotková hladká svalovina postrádá elektrické synapse a elektrický signál se proto z jedné buňky na druhou nešíří. Vyznačuje se ale výraznou inervací, což umožňuje jemnou regulaci kontrakce. Nachází se např. v duhovce oka. (Langmeier 2009)

3.5 Regulace vasokonstrikce a vasodilatace

Řízení krevního oběhu musí zajistit dva často protichůdné požadavky. Na jedné straně zachování celkového krevního oběhu, tedy udržení minutového objemu srdečního a dostatečného tlakového gradientu v oběhu. Na straně druhé uspokojení rozdílných požadavků jednotlivých tkání a orgánů na prokrvení. (Trojan 1999) Proto byly vyvinuty regulační mechanismy, které lze rozdělit na místní a celkové:

- místně je regulován průtok krve jednotlivými tkáněmi a orgány podle aktuální potřeby, hladká svalovina arteriol reaguje na místní podněty;
- centrálně je udržován stálý tlak krve při změnách prokrvení jednotlivých orgánů, hladká svalovina arteriol reaguje na pokyny z mozkového kmene.

Ve všech tkáních se uplatňují oba výše popsané mechanismy, jejich míra projevu se ale liší. Centrální řízení převažuje v regulaci průtoku krve kůží a splachnikem, místní řízení si udrželo vysokou autonomii v životně důležitých orgánech, v srdci a mozku. (Langmeier 2009)

3.5.1 Místní regulační mechanismy

Místní regulační mechanismy mají dva hlavní úkoly: udržet stálý průtok krve tkání i při změně tlaku a reagovat na změněnou potřebu prokrvení tkáně při její metabolické aktivitě. (Langmeier 2009)

Místní regulační mechanismy jsou nezávislé na působení nervů a hormonů. Arterioly tkání a orgánů mění svůj periferní odpor, čehož využívají k autoregulaci průtoku krve. Tato autoregulace je patrná při jevech, jako je akutní a reaktivní hyperémie, autoregulace průtoku krve tkání jako reakce na změnu tlaku krve a lokální překrvení při zánětu. (Widmaier et al. 2016)

3.5.1.1 Metabolická regulace

Metabolická regulace zajišťuje řízení průtoku krve tkání nebo orgánem podle jejich akutní potřeby přísunu kyslíku a živin a odvodu metabolitů. Jde o fylogeneticky nejstarší a nejjednodušší mechanismus regulace krevního oběhu. (Langmeier 2009)

Metabolická regulace je hlavním mechanismem jevu, zvaného aktivní hyperémie. Většina tkání a orgánů reaguje na svou zvýšenou aktivitu zvýšením prokrvení, což je důsledek dilatace arteriol. Tato dilatace je způsobená relaxací hladkého cévního svalu. Ten tak reaguje na chemické změny v extracelulární tekutině obklopující arterioly. Nejsignifikantnější změnou způsobenou zvýšeným metabolismem tkáně je snížení místní koncentrace kyslíku. Roste naopak koncentrace CO₂ (jako koncového produktu oxidativního metabolismu), H⁺ (např. v podobě kyseliny mléčné, projevuje se vzestupem pH), adenosinu (produkt štěpení ATP), K⁺, eikosanoidů (jako produktu štěpení fosfolipidů buněčné membrány, jejich koncentrace stoupá a způsobuje vasodilataci i při zánětu), bradykininu (vlivem nárůstu koncentrace kalikreinu, secernovaného aktivními žlázami) a oxidu dusnatého. (Widmaier et al. 2009)

Dále se metabolická regulace uplatňuje při reaktivní hyperémii, kdy tkáň reaguje na dočasnou zástavu průtoku krve po jeho náhlém obnovení masivním prokrvením. Při zástavě průtoku je v cévě snížená koncentrace O₂ a hromadí se metabolity. To vede k výrazné dilataci cév podle výše popsaného mechanismu. Po obnovení průtoku se takto dilatované cévy naplní krví a dochází k hyperémii. (Widmaier et al. 2009)

3.5.1.2 Myogenní autoregulace

Spolu s metabolickou regulací se podílí na udržení průtoku krve tkání i při změně krevního tlaku.

Princip myogenní autoregulace spočívá v tom, že zvýšený tlak krve vyvolá zvýšené napětí cévní stěny, které má za následek kontrakci hladké cévní svaloviny a tedy zmenšení průsvitu cévy. (Langmeier 2009)

3.5.2 Centrální regulační mechanismy

Hlavním úkolem celkové regulace oběhu krve je řízení minutového srdečního výdeje a celkového periferního odporu tak, aby byl neustále udržován tlakový gradient nezbytný pro udržení toku krve v cévách. (Trojan 1999)

3.5.2.1 Nervové mechanismy

Nervové mechanismy řízení periferního odporu jsou fylogeneticky mladší a složitější než místní regulace. Jejich hlavní úlohou je zajištění stálého tlaku krve pomocí redistribuce minutového srdečního objemu. (Langmeier 2009, Trojan 1999) Nervové mechanismy jsou řízeny centrálně, jednotlivé orgány mají v nervové regulaci jen minimální autonomii. Tyto mechanismy jsou zprostředkovány autonomním nervovým systémem, především sympatikem, prostřednictvím jeho mediátoru noradrenalinu (NA). (Trojan 1999)

Významnou inervaci sympatikem vykazují především arterioly kosterního svalstva, kůže, splachniku a ledvin. (Trojan 1999) NA v nich vyvolává působením na α_1 -adrenergní receptory vasokonstrikci. Protože sympatické nervy vykazují vždy určitou klidovou vzruchovou frekvenci, vyvolávají vždy jistý stupeň klidového svalového napětí. Snížení aktivity sympatiku pod tuto základní úroveň vyvolává vasodilataci. (Widmaier et al. 2016)

Parasympatikus hraje v regulaci průtoku krve cévou malou roli, jeho vasodilatační účinek se uplatňuje především v krevním zásobení zevního genitálu, kde zajišťuje zvýšené prokrvení při sexuálním vzrušení. (Trojan 1999)

Aktuální stav krevního oběhu monitoruje množství receptorů. Aferentními drahami vysílají zjištěné informace do vasomotorických center v prodloužené míše. Odsud jsou eferentními drahami vysílány pokyny do myokardu a hladkých svalů cév. Nejvýznamnější jsou baroreceptorové reflexy.

V oblouku aorty, v karotickém sinu a ve velkých arteriích jsou umístěny baroreceptory, které monitorují krevní tlak. Informace o zvýšeném tlaku předávají do mozkového kmene, kde způsobí útlum sympatiku a stimulaci parasympatiku. Výsledkem je snížení minutového srdečního výdeje a dilatace cév, způsobující pokles periferní rezistence. (Langmeier 2009)

3.5.2.2 Hormonální mechanismy

Z hormonů ovlivňujících změny v průtoku krve cévami mají největší význam hormony dřeně nadledvin: adrenalin a noradrenalin. Oba se mohou, stejně jako noradrenalin uvolněný z neuronů sympatiku, vázat na α -adrenergní receptory cévní stěny

a vyvolávat tak vasokonstrikci. Adrenalin se krom toho může vázat i na β_2 receptory, působením na tyto receptory vyvolává vasodilataci. (Katzung 2006)

V praxi to znamená, že v cévách, kde převažují α receptory, vyvolává adrenalin konstrikci, kdežto v cévách s převažujícími β_2 receptory vyvolává dilataci. Pokud jsou v cévě zastoupeny α a β_2 receptory v podobném počtu, záleží na koncentraci adrenalinu. Pro aktivaci β_2 receptorů stačí nižší koncentrace adrenalinu než pro aktivaci α receptorů – ty však mají při současné aktivaci obou typů receptorů převažující účinek. Prakticky to znamená, že nižší koncentrace adrenalinu vyvolávají vasodilataci, kdežto vyšší koncentrace vasokonstrikci. (Trojan 1999)

Hormonálním mechanismem se na regulaci krevního tlaku podílí také renin-angiotenzin-aldosteronový systém (RAAS). Renin je hormon uvolňovaný aferentními arterioly juxtaglomerulárního aparátu ledvin. Katalyzuje štěpení plazmatické bílkoviny angiotenzinogenu na angiotenzin I. Angiotenzin I je v krvi (především v plicích) přeměněn angiotenzin konvertujícím enzymem (ACE) na angiotenzin II, který prostřednictvím svých receptorů AT_1 a AT_2 vykazuje silný vasokonstrikční účinek na rezistenční cévy. (Lüllmann et al. 2002, Langmeier 2009)

3.5.2.3 Endotelová regulace

Na regulaci průtoku krve cévou se podílí i endotel, který je místem uvolňování řady vasodilatačně a vasokonstrikčně působících látek.

Důležitým vasodilatačním působkem uvolňovaným endotelem je oxid dusnatý (NO) (Lüllmann et al. 2002), do r. 1986 chemicky neidentifikovaný a nazývaný EDRF (endothelium derived relaxing factor). (Catravas 2013) NO je uvolňován endotelem kontinuálně a podílí se na udržení bazální úrovně vasodilatace. Množství NO produkovaného endotelem výrazně stoupá jako reakce na určité podněty. (Widmaier et al. 2016) Endotel je stimulován k syntéze NO řadou látek, např. acetylcholinem, histaminem a bradykininem, ale také jako odpověď na mechanické faktory, např. smykové napětí krevního proudu (shear-stress). (Lüllmann et al. 2002, Karásek a Vaverková 2009) NO uvolněný z endotelu difunduje do sousedících hladkosvalových buněk cév v tunica media, kde aktivuje enzym guanylátcyklázu. Aktivovaná guanylátcykláza katalyzuje syntézu cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP), který se podílí na relaxaci cévy. (Lüllmann et al. 2002)

Dalším vasodilatátorem produkovaným endotelem je prostacyklin (prostaglandin I₂, PGI₂), uvolňovaný vlivem hypoxie, zvýšeným průtokem a řadou působků. Zvýšením hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v buňkách hladké svaloviny a v trombocytech působí relaxačně na cévní sval a ovlivňuje srážení krve. (Karásek a Vaverková 2009)

Hyperpolarizační faktor odvozený od endotelu (EDHF) je dosud chemicky neznámá látka, která otvírá draslíkové kanály v buňkách hladkého svalu cévního. To vede k hyperpolarizaci těchto buněk a následné relaxaci cév. (Púzserová 2016)

Endoteliny jsou skupina peptidů s vasokonstričními účinky. Byly identifikovány tři izoformy: ET-1, ET-2 a ET-3, převládající je sekrece ET-1. (Katzung 2006) Jejich uvolňování z endotelu je stimulováno řadou chemických a mechanických podnětů. (Widmaier et al. 2016) Při intravenózním podání působí endoteliny přechodné snížení krevního tlaku (vyvolané uvolněním PGI₂ a NO), následované jeho dlouhotrvajícím zvýšením (přímým působením na endotel). (Katzung 2006) Endoteliny působí parakrinně, za určitých podmínek ale mohou dosáhnout takových koncentrací v krvi, že mohou působit endokrinně a vyvolávat rozsáhlou vasokonstrikcí. (Widmaier et al. 2016)

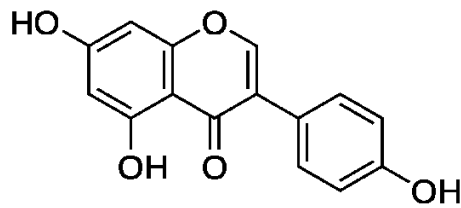
3.6 Isoflavonoidy

Isoflavonoidy tvoří skupinu více než 800 látek odvozených od 3-fenylchromanu. Jsou typické pro čeleď *Fabaceae*, ale byly nalezeny i v zástupcích rodu *Podocarpus* sp., *Juniperus* sp. a dalších. Zahrnují isoflavony, isoflavanony a isoflavany, lišící se stupněm oxidace. Nejvíce jsou v přírodě rozšířeny isoflavony, vyskytující se volně nebo jako C- nebo O-glykosidy. Mezi nejvýznamnější isoflavonoidy patří genistein, daidzein, formononetin, glycitein a biochainin A. (Spilková 2016)

Isoflavonoidy se řadí mezi fytoestrogeny. Svou strukturou se podobají 17-β-estradiolu a mají schopnost vázat se na estrogenní receptory, především na ERβ. Isoflavonoidy mají schopnost aktivovat estrogenní signální dráhy a zasahovat do metabolismu steroidních hormonů. (Pilšáková et al. 2010)

Isoflavonoidy mají řadu účinků na lidský organismus. Zahrnují antioxidantní a protizánětlivé účinky, inhibici proliferace rakovinných buněk a prevenci kardiovaskulárních onemocnění a osteoporózy. (Qinglu et al. 2013)

3.6.1 Genistein



Obr. 4 Chemická struktura genisteinu.

Genistein (viz Obr. 4) je biosynteticky nejjednodušším isoflavonoidem, který se nachází ve více než 80 druzích rostlin čeledi *Fabaceae*. (Kaufman et al. 1997) Hlavním zdrojem genisteinu v lidské stravě je sója (*Glycine max*) a sójové produkty – tofu, fermentovaná sójová pasta miso, sójová omáčka a sójové mléko. (Wakai et al. 1999) Dalšími zdroji genisteinu jsou rostliny *Psoralea corylifolia*, lupina (*Lupinus spp.*), bob obecný (*Vicia faba*) a puerarie laločnatá (*Pueraria lobata*), známá také pod názvem „kořen kudzu“. (Kaufman et al. 1997)

Genistein je v rostlinách přítomen ve formě svého glykosidu genistinu. Z něho se uvolňuje zpět do formy aglykonu po úpravě fermentací nebo v průběhu trávení. (Ganai a Farooqi 2015)

Díky své strukturální podobnosti s estrogény má genistein schopnost vázat se na estrogenní receptory a řadí se proto k fytoestrogenům. (Dixon a Ferreira 2002)

Genistein funguje jako inhibitor tyrozinkinázy, především receptoru pro epidermální růstový faktor. (Akiyama 1987)

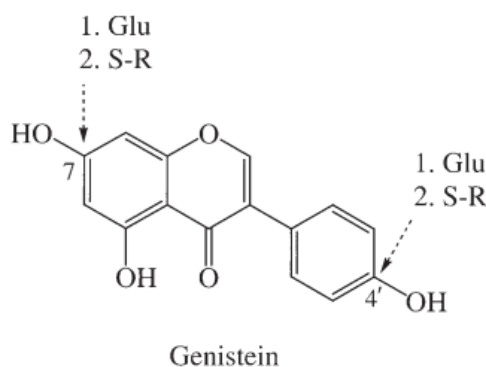
Jeho biologickou aktivitu zkoumá řada studií. Zaměřují se především na jeho preventivní účinky vůči karcinogenezi (hlavně u rakoviny prsu, ale i jater, žaludku, močového měchýře, plic, prostaty a kolorektálního karcinomu. (Russo et al. 2016, Spagnuolo et al. 2015, Dixon a Ferreira 2002) Mezi mechanismy účinku genisteinu lze řadit inhibici angiogeneze a inhibici buněčné proliferace. (Fotsis et al. 1995, Farina et al. 2006)

Genistein dále vykazuje pozitivní vliv při prevenci a léčbě postmenopauzální ztráty kostní hmoty a osteoporózy, kardiovaskulárních chorob (příznivým vlivem na spektrum krevních lipidů a vasodilatačním účinkem) a příznaků menopauzy. (Polkowski a Mazurek 2000, Squadrito et al. 2002)

Genistein při dlouhodobém podávání posiluje na endotelu závislou vasodilataci prostřednictvím zvýšení plazmatické hladiny NO a snížení hladiny endothelinu-1. Možným mechanismem zvýšení hladiny NO je zvýšení aktivity endoteliální NO synthasy. Při hledání mechanismu snížení hladiny endothelinu-1 se uvažuje o inhibici exprese genu pro endothelin, zapříčiněné specifickou tyrozinkinázovou aktivitou genisteinu. Druhou možností je, že hladina endothelinu-1 klesá díky zvýšení hladiny NO, který má schopnost regulovat produkci endothelinu-1. (Squadrito et al. 2002)

Genistein vykazuje nízkou biodostupnost po orálním podání, což je zapříčiněno rozsáhlou metabolizací a efluxním transportem. (Yang et al. 2012)

Po orální aplikaci je genistein rychle a téměř zcela absorbován tenkým střevem. Jen asi 3% přijatého genisteinu jsou v plazmě po absorpci přítomna ve formě aglykonu, většina podaného genisteinu je okamžitě konjugována s kyselinou glukuronovou nebo se sulfátem. (Yang et al. 2012). Genistein může podstoupit konjugaci ve dvou polohách (viz Obr. 5), proto může být přítomný v plazmě ve formě monoglukuronidů, monosulfátů, diglukuronidů, disulfátů a smíšených konjugátů. (Shellnut et al. 2002) Převažujícím konjugátem je genistein-7-O-glukuronid. Metabolismus genisteinu se odehrává především v játrech a v epiteliálních buňkách stěny tenkého střeva. (Kwon et al. 2007) Shellnut et al. (2002) naznačují, že konjugáty genisteinu mohou mít vlastní biologickou aktivitu nebo sloužit jako zdroj aglykonu v cílové tkáni.



Obr. 5 Chemická struktura genisteinu. Vyznačena jsou místa, která mohou být glukuronidována nebo sulfatována. (Převzato z: Shellnut et al. 2002)

Na first-pass efektu v metabolizaci genisteinu se kromě střeva podílí i játra. Po absorpci enterocyty a konjugaci vstupuje genistein vrátnicovou žilou do jater. Zde je zbývající aglykon genisteinu metabolizován na konjugáty, případně oxidován na své

koncové metabolity. Produkty jaterního metabolismu jsou vyloučeny žlučí do střeva. Díky aktivitě bakterií tenkého a tlustého střeva mohou být konjugáty hydrolyzovány a aglykon opět vstřebán střevní stěnou, dochází tedy k enterohepatální cirkulaci. (Yang et al. 2012)

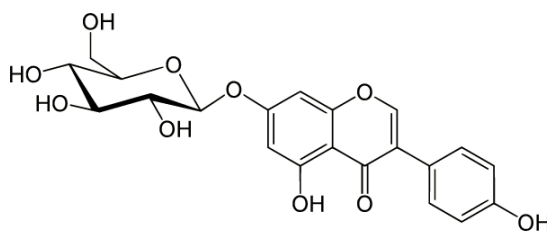
Genistin může podstupovat i enterickou cirkulaci. Genistein zmetabolizovaný enterocyty může být vyloučen zpět do lumen střeva pomocí efluxních transportérů. Podobně jako při enterohepatální cirkulaci mohou být konjugáty štěpeny intestinální mikroflórou a reabsorbovány střevní stěnou. (Yang et al. 2012)

Díky duální cirkulaci se genistein a jeho konjugáty koncentrují v GIT a v játrech více než v ostatních tkáních. (Yang et al. 2012)

Malou část metabolismu genisteinu tvoří oxidace jaterními mikrosomálními enzymy na hydroxyderiváty (3'-OH-genistein, 6-OH-genisten, 8-OH-genistein) a štěpení bakteriální mikroflórou přes dihydrogenistein a 6'-hydroxy-O-desmetylangolesin až na koncové produkty kyselinu 2,4,6-trihydroxybenzoovou, 4-ethylfenol, 1,3,5-trihydroxybenzen a kyselinu 2-(4-hydroxyfenyl)propionovou. (Yang et al. 2012, Coldham et al. 2002)

Genistein je z těla vyloučen stolicí a močí ve formě svých metabolitů, především konjugátů, dihydrogenisteinu, 6'-OH-O-desmetylangolensinu, trihydroxybenzenu a 3',4',5,7-tetrahydroxyisoflavonu. (Kwon et al. 2007)

3.6.2 Genistin



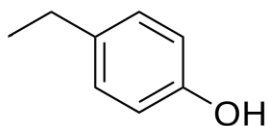
Obr. 6 Chemická struktura genistinu.

V sóje a sójových produktech je genistein obsažen převážně ve formě svého glykosidu genistinu (viz Obr. 6). Asi třetina orálně přijatého genistinu je štěpena β -glukosidásami tenkého střeva a enterobakteriemi tlustého střeva na svůj aglykon genistein. Zbylé dvě třetiny jsou absorbovány enterocyty v glykosidické formě. Genistin přechází přes membránu enterocytů pasivním transportem ve své intaktní formě. (Kwon

et al. 2007) Řada studií srovnávala biodostupnost genistinu a genisteinu po orálním podání, jejich výsledky se od sebe ale výrazně liší. (Yang et al. 2012) Při orálním podání samostatných látek je genistin absorbován několikanásobně pomaleji než genistein, což je pravděpodobně zapříčiněno větší molekulou a nižší lipofilitou genistinu. (Kwon et al. 2007)

Řada studií zkoumá schopnost genistinu snižovat redukci kostní hmoty (Takehiko et al. 2001), zpomalovat růst tumorů a preventivně bránit jejich vzniku (Choi et al. 2006, Hamdy et al. 2012) a působit antioxidačně. (Chung et al. 2006)

3.6.3 4-etylfenol



Obr. 7 Chemická struktura 4-etylfenolu.

4-etylfenol (viz Obr. 7) je koncový produkt štěpení genisteinu střevní mikroflórou. (Coldham et al. 2002). Má význam jako složka červeného vína, kterému propůjčuje specifické aroma. (Milheiro et al. 2017)

4 Cíl práce

Cílem této práce bylo zjištění vlivu vybraných látek ze skupiny isoflavonoidů a jejich metabolitů *in vitro* na izolovanou aortu potkana.

- Pomocí křivky dávka-účinek (drug-response curve, DRC) zjistit schopnost genistinu, genisteinu a 4-etylfenolu relaxovat aortu potkana prekontrahovanou pomocí noradrenalinu.

- Porovnat testované látky pomocí zjištěných hodnot koncentrace navozujících 50% účinek (EC_{50}).

5 Experimentální část

5.1 Zvířata a materiál

5.1.1 Pokusná zvířata

Pro účely experimentu byli použiti samci potkana kmene Wistar:Han o hmotnosti 300 – 400g. Zvířata byla dodána firmou MediTox s.r.o. Konárovice. Zvířata byla k pokusu použita po uplynutí nejméně sedmidenní aklimatizace ve viváriu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Byla krmena standardní peletizovanou potravou a měla volný přístup k pitné vodě.

Průběh experimentů probíhal 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 Použité chemikálie

Tab. 1 Použité chemikálie.

Název chemikálie	Vzorec	M_r	Výrobce
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH_2PO_4	136,09	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česká republika
Chlorid sodný p.a.	NaCl	58,44	Penta Chrudim, Česká republika
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	CaCl_2	110,99	Lachema Brno, Česká republika
Hydrogenuhlíčan sodný p.a.	NaHCO_3	84,01	Penta Chrudim, Česká republika
Chlorid draselný p.a.	KCl	74,56	Lachema Brno, Česká republika
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,47	Lachema Brno, Česká republika
D-glukosa monohydrát p.a.	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	180,16	Penta Chrudim, Česká republika
Noradrenalin bitartrát monohydrát p.a.	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	337,28	Sigma-Aldrich, Německo

Nitroprusid sodný dihydrát p.a.	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	297,95	Sigma-Aldrich, Německo
Acetylcholin jodid p.a.	$(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{I})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOC}$ H_3	273,1	Sigma-Aldrich, Německo
Dimetylsulfoxid (DMSO)	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	78,13	Sigma-Aldrich, Německo
Uretan	$\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2$	89,09	Sigma-Aldrich, Německo

Příprava Krebsova živného roztoku

Látky (Tab. 2) kromě chloridu vápenatého byly naváženy a rozpuštěny v malém množství destilované vody. Chlorid vápenatý byl rozpuštěn v destilované vodě odděleně od ostatních látek, aby se předešlo vysrážení slabě rozpustných vápenatých solí. Roztok chloridu vápenatého byl přidán k roztoku ostatních látek. Na závěr byl roztok doplněn destilovanou vodou na požadovaný objem.

Tab. 2 Složení Krebsova živného roztoku.

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

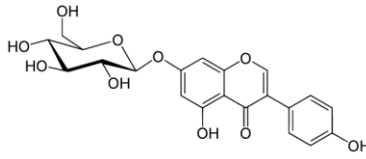
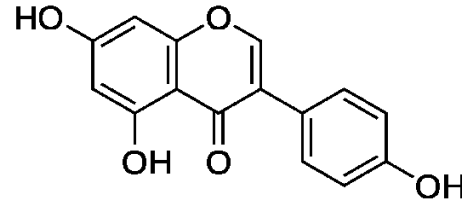
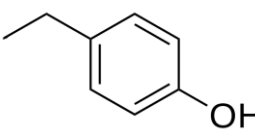
5.1.3 Přístroje a pomůcky

1. Aparatura pro izolovanou tkáň ex vivo; Multi chambre tissue bath system [Experimentia Ltd, Budapešť, Maďarsko]
2. Vyhodnocovací software; S.P.E.L., Advanced Kymograph Software SOFT -03-KYMO, [Experimentia Ltd, Budapešť, Maďarsko]
3. Laboratorní sklo, laboratorní lžička, mikropipety
4. Třepačka IKA Vortex Genius 3 [IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo]
5. Laboratorní váhy [Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo]

6. Operační nástroje (operační stolek, nůžky, peán, pinzety)
7. Plynová lahev s pneumoxidem (směs 95 % O₂ a 5 % CO₂) [Linde gas]
8. Software GraphPad Prism version 6.

5.1.4 Testované látky

Tab. 3 Látky testované na izolované aortě.

Látka	Strukturní vzorec	M_r	Výrobce
Genistin		432,37	Extrasynthese, Francie
Genistein		270,24	Extrasynthese, Francie
4-etylfenol		122,16	Sigma- Aldrich, Německo

5.2 Metodika

5.2.1 Průběh experimentu

5.2.1.1 Izolace a příprava tkáně

Uspání zvířete: Potkan kmene Wistar:Han byl ponechán 24 hodin nalačno a následně uveden do celkové anestezie i.p. podaným uretanem v dávce 1,2 g/kg. Byl použit roztok o koncentraci 20 g/100 ml, objem roztoku anestetika byl vypočítán podle hmotnosti konkrétního pokusného zvířete. (Tab. 4) Zvíře bylo usmrceno vykrcením.

Tab. 4 Objem roztoku anestetika podle hmotnosti konkrétního zvířete.

Hmotnost zvířete (g)	200	225	250	275	300	325	350	375
Aplikovaný objem (ml)	1,2	1,35	1,5	1,65	1,8	1,95	2,1	2,25

Vynětí aorty a příprava preparátů: Hrudní dutina byla podélně nastřížena, zvíře vykrceno a po vykrcení byla vyňata hrudní část aorty. Aorta byla ihned po vyjmutí vložena do Petriho misky s Krebsovým roztokem o pH 7,4 (135 mmol/l NaCl, 5,0 mmol/l KCl, 2,5

mmol/l CaCl₂, 1,3 mmol/l MgSO₄, 1,2 mmol/l KH₂PO₄ 20 mmol/l NaHCO₃ a 10 mmol/l glukózy). Po očištění aorty od okolní pojivové a tukové tkáně byla céva nastříhána na 5 mm dlouhé segmenty. Při preparaci bylo třeba dbát opatrnosti, aby nedošlo k porušení integrity endotelové vrstvy.

Jednotlivé aortální kroužky byly zavěšeny na nosič tkáně a háček spojený s převodníkem, který převádí mechanickou energii na elektrickou. Převodník byl spojen s počítačem S.P.E.L. Advanced Kymograph Software (Experimetria Ltd, Maďarsko). Pomocí tohoto mechanismu bylo měřeno isotonické napětí cévy. Jednotlivé preparáty byly ponořeny do 5 ml Krebsova roztoku, temperovaného na 37°C, okysličovaného pneumoxidem (95% O₂ / 5% CO₂).

Stabilizace a zátěž tkáně: Aortální kroužky byly nataženy na 2 g a stabilizovány po dobu 45 minut. V průběhu stabilizace byl vždy po deseti minutách měněn Krebsův roztok za čerstvý.

Testování kontraktility a funkce endotelu: Do lázně s Krebsovým roztokem bylo přidáno 50 µl NA o koncentraci 10⁻³ M (konečná koncentrace v lázni byla 10⁻⁵ M) a byla navozena kontrakce, která se stabilizovala přibližně za 30 minut. Pro ověření neporušenosti endotelové vrstvy, která mohla být porušena v průběhu preparace, bylo do lázně přidáno 50 µl acetylcholinu (acetylcholin měl v lázni 10⁻⁴ M). V případě, že zůstal endotel neporušený, došlo k relaxaci cévy (Taylor et al. 1988). Po skončení testování kontraktility a funkce endotelu byl Krebsův roztok několikrát vyměněn. Po ustálení hodnot následoval vlastní experiment.

5.2.1.2 Vlastní experiment

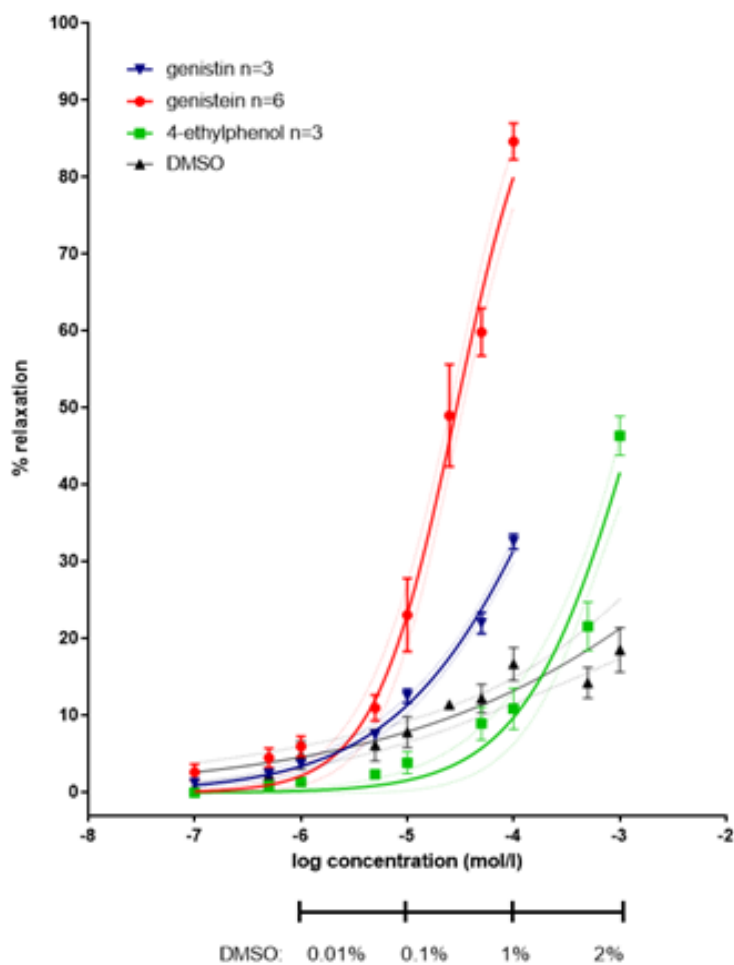
Do lázně s preparátem bylo přidáno 50 µl NA o koncentraci 10⁻³ M (konečná c v lázni 10⁻⁵ M) a opět navozena kontrakce. Po dosažení maximální kontrakce a stabilizaci odpovědi byla do lázně přidávána testovaná látka kumulativně ve vzrůstajících koncentracích, aby finální koncentrace testované látky v lázni stoupaly od 10⁻⁷ do 10⁻³ M, případně u méně účinných látek od 10⁻⁷ – 10⁻⁴ M. Po ustálení hodnot byly výsledky zaznamenány. Při každém pokusu vždy sloužil jeden aortální kroužek jako kontrola – do roztoku bylo přidáváno pouze vehikulum bez testované látky.

Ukončení experimentu: Do lázně byl přidán nitroprusid sodný (50 µl, 10 µM, konečná koncentrace v lázni 0,1 µM). Navozená relaxace byla považována za maximální (Taylor et al. 1988).

5.2.2 Vyhodnocení

Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí počítačového programu GraphPad Prism5. Relaxace tkáně navozené jednotlivými koncentracemi testované látky byly přepočteny na procenta z maximální relaxace. Získané hodnoty byly poté vyneseny do grafu, který znázorňuje závislost procentuální relaxace aorty na logaritmické koncentraci testovaného vzorku. Pomocí vnesených hodnot byla sestrojena relaxační křivka a z ní určena hodnota EC_{50} , tedy koncentrace vyvolávající 50 % možné relaxace. Pro každou křivku i pro hodnoty EC_{50} byly určeny také 95% konfidenční intervaly.

6 Výsledky



Obr. 8 DRC křivky testovaných látek. Porovnání vasorelaxačních účinků genisteinu, genistinu, 4-etylphenolu a kontroly (DMSO) na izolovanou potkaní aortu. Každá křivka je tvořena průměrem z nejméně tří měření. Koncentrace DMSO je vyjádřena v procentech pod osou x.

Látky byly zkušeny na aortálních kroužcích, které byly stabilně a dlouhodobě prekontrahovány noradrenalinem. Testované látky byly zkušeny na cévách s neporušeným endotelem, což bylo ověřeno působením acetylcholinu.

Kumulativním přidáváním zvyšujících se dávek testovaných látek bylo dosaženo koncentrací v rozmezí 10^{-7} – 10^{-3} M, u méně účinných látek jsme měřili jen v rozmezí 10^{-7} – 10^{-4} M. Látky vyvolaly dávkově závislou vasorelaxaci, která však nikdy nedosáhla 100% relaxace. (viz Obr. 8)

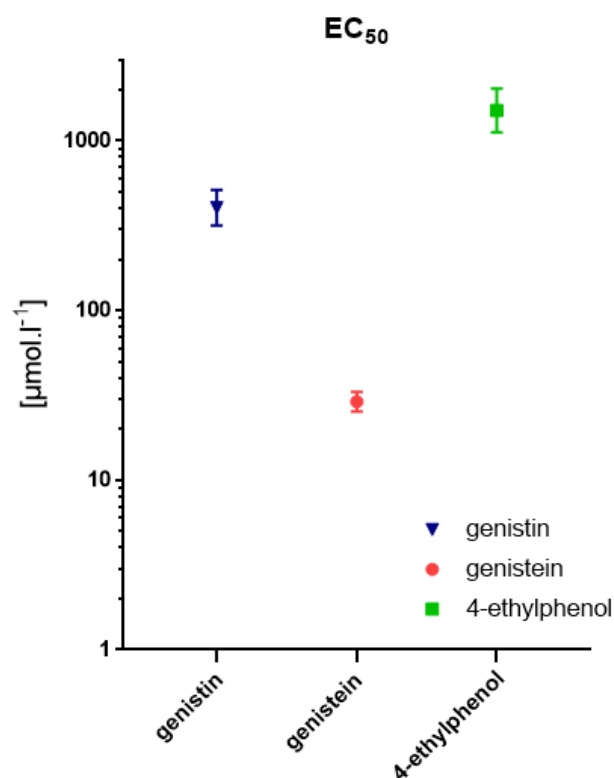
Genistein vyvolal ze zkoušených látek největší, více než 80% vasorelaxaci. Účinek vykázal i genistin, vyvolal ale podstatně nižší maximální relaxaci (35%). Nejnižší účinek vykázal 4-etylphenol. V dávkách do 10^{-4} M vyvolal dokonce nižší vasorelaxaci než kontrola (DMSO), ve vyšších dávkách dosáhl jen částečné vasorelaxace (40%).

Porovnáním 95% konfidenčních intervalů relaxace aortálních kroužků získáme následující řadu: genistein > genistin > 4-etylphenol > DMSO (kontrola).

Při srovnání hodnot EC_{50} dojdeme ke stejné řadě. (viz Tab. 5, Obr. 9)

Tab. 5 Srovnání hodnot EC_{50} genisteinu, genistinu a 4-etylphenolu.

Zkoušená látka	EC_{50} (M)	Konfidenční interval 95% (M)
Genistein	$2,903 \cdot 10^{-5}$	$2,544 \cdot 10^{-5} - 3,313 \cdot 10^{-5}$
Genistin	$4,045 \cdot 10^{-4}$	$3,180 \cdot 10^{-4} - 5,146 \cdot 10^{-4}$
4-etylphenol	$1,509 \cdot 10^{-3}$	$1,125 \cdot 10^{-3} - 2,025 \cdot 10^{-3}$



Obr. 9 Srovnání hodnot EC_{50} genistinu, genisteinu a 4-etylphenolu.

7 Diskuze

Předkládaná práce svým zaměřením navazuje na práci Výzkumné skupiny kardiiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v oblasti kardioprotektivních účinků flavonoidních látek na lidský organismus. Byly zkoumány 3 látky ze skupiny isoflavonoidů a jejich metabolitů: genistein, genistin a 4-etylphenol.

Flavonoidy jsou rozsáhlou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů polyfenolického typu. Jsou v přírodě hojně rozšířené, v cévnatých rostlinách bylo popsáno více než 4000 látek. Hlavními zdroji flavonoidů v lidské stravě jsou zelenina, semena, citrusy, olivový olej, čaj a červené víno. (Middleton et al. 2000)

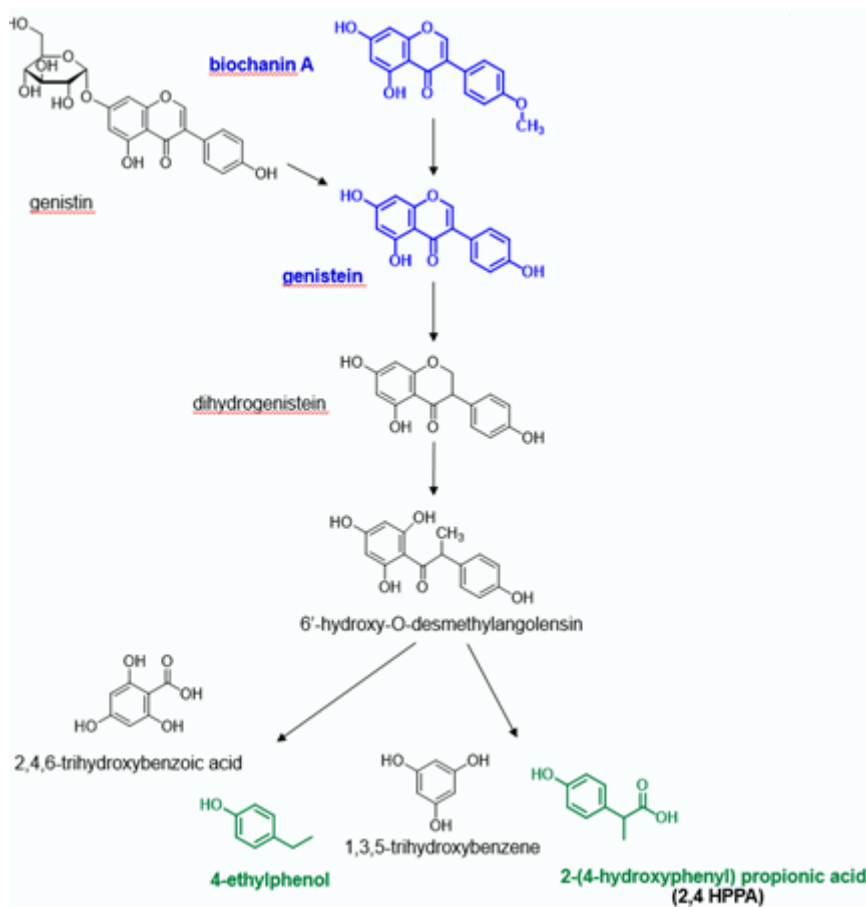
Strukturně se jednotlivé flavonoidy liší stupněm oxidace pyranového kruhu, počtem a polohou substituentů (především hydroxylových a methoxylových skupin) na obou aromatických kruzích a napojením cukrů nebo organických kyselin.

Účinky flavonoidů na lidský organismus jsou široké a zahrnují schopnost normalizovat permeabilitu kapilár, snižovat jejich lomivost, působit antihemoragicky a antiedematózně. Některé rozšiřují cévy, snižují krevní tlak, působí antiagregačně. Flavonoidy mají antioxidační aktivitu, jsou schopné eliminovat volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku při jejich nadprodukci v lidském organismu. Některé chelatují železo a měď, působí protizánětlivě. Potencují účinek vitamínu C, je tedy možno je využít jako podpůrné prostředky při léčbě infekčních nemocí. (Spilková 2016)

Zkoumané látky genistein a genistin patří mezi isoflavonoidy. Isoflavonoidy jsou podskupinou flavonoidů, jejich struktura je odvozená od 3-fenylchromanu. V největší míře jsou zasoupeny v čeledi *Fabaceae*, především v sóje luštinaté, v nižší míře pak v čeledi *Linaceae*, v semenech lnu setého. (Birt et al. 2001, Setchell a Cassidy 1999) Isoflavonoidy projevují v lidském těle jak nehormonální, tak hormonální aktivitu, které je daná strukturální podobností isoflavonoidů s estrogenními hormony. Proto bývají někdy označovány jako „fytoestrogeny“. Díky těmto účinkům mohou mít isoflavonoidy pozitivní vliv při terapii nádorů, menopauzálních symptomů, kardiiovaskulárních chorob a osteoporózy. (Setchell a Cassidy 1999)

Podávání flavonoidů v potravě může pozitivně ovlivnit funkci endotelu a podpořit relaxaci cév. (Tanwar a Mogdil 2012).

V rámci jiných prací již byl *in vitro* potvrzen vasodilatační účinek řady flavonoidů a jejich metabolitů: kvercetin, isorhamnetin, tamarixetin, 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny, 3-kumarové kyseliny, 3,4-dihydroxyskořicové kyseliny, 4-metylkatecholu (Najmanová 2017), formanonetin, isoformononetin (Pešková 2017), glycitein, tectorigenin a daidzein (Novýsedláková 2017). Předkládaná práce doplňuje informace o vasorelaxačních účincích genistinu a jeho metabolitů genisteinu a 4-etylphenolu.



Obr. 10 Schéma biotransformace genistinu střevní mikroflórou. (Modifikováno dle: Coldham et al. 2002, Rüfer a Kulling 2006, Frankenfeld 2011)

Střevní mikroflóra metabolizuje genistin přes genistein, dihydrogenistein, 6'-hydroxy-O-desmetylangolesin až na koncové produkty kyselinu 2,4,6-trihydroxybenzoovou, 4-etylphenol, 1,3,5-trihydroxybenzen a kyselinu 2-(4-hydroxyfenyl)propionovou. (viz Obr. 10) (Coldham et al. 2002)

Prvním krokem metabolismu glykosidu genistinu je jeho hydrolýza na aglykon genistein. Odstraněním cukerné složky genistinu došlo ke zvýšení vasorelaxační

účinnosti látky. To odpovídá teorii Hammada a Abdally (1997), kteří říkají, že přítomnost cukru v molekule flavonoidu snižuje jeho biologickou aktivitu. Vyšší účinek genisteinu by bylo možno očekávat *in vivo* po metabolizaci střevní mikroflórou.

Srovnání vasorelaxační účinnosti genisteinu se strukturně podobnými isoflavonoidy naznačuje více o významu jednotlivých substituentů na isoflavonovém kruhu.

Daidzein se od genisteinu odlišuje pouze chybějící hydroxyskupinou v poloze 6 isoflavonového skeletu. Tato změna struktury se odrazila ve zvýšení maximální vasorelaxace daidzeinu o 10 % oproti genisteinu. (Novýsedláková 2017) Můžeme z toho proto usuzovat, že hydroxyskupina v poloze 6 snižuje vasorelaxační účinnost.

Naopak glycitein, který má v poloze 6 metoxyskupinu, vykázal maximální relaxaci téměř 100%. (Novýsedláková 2017) Podobnou strukturu s metoxyskupinou v poloze 7 má isoformonetin, který také vykazuje vysokou maximální relaxaci (Pešková 2017). Z toho můžeme vyvodit, že metoxyskupina v poloze 6 a 7 zvyšuje vasorelaxační aktivitu isoflavonoidů.

Absence účinku 4-etylphenolu naznačuje, že neporušený isoflavonový skelet je pro účinek metabolitů genisteinu nezbytný.

Účinný genistein může vznikat i metabolismem biochaninu A. Wang et al. (2002) za použití mírně odlišné metodiky prokázal jeho vasodilatační účinek, vyšší (97% relaxace, $EC_{50}=5,8 \cdot 10^{-5}$ mol/l) než námi změřený účinek genisteinu. Změření vasorelaxačního účinku biochaninu A a genisteinu stejnou metodou by mohlo přinést informaci o vlivu metylace hydroxylové skupiny genisteinu v poloze 4'.

Naše měření probíhala na aortálních kroužcích s neporušeným endotelem. Li et al. (2004) prokázali mírně odlišnou metodikou, že vasorelaxační účinek genisteinu je na endotelu nezávislý.

Tato diplomová práce přinesla určité dílčí výsledky, vyvolala ale i další náměty ke studiu. Bylo by vhodné zaměřit se zejména na:

- objasnění mechanismu účinku genisteinu
- ověření, zda i naše metodika potvrdí nezávislost účinku genisteinu na endotelu

- výzkum vasodilatačních účinků dalších metabolitů genisteinu: dihydrogenisteinu, 6'-hydroxy-O-desmetylangolesinu, případně konečných produktů štěpení, kyseliny 2,4,6-trihydroxybenzoové, 1,3,5-trihydroxybenzenu a kyseliny 2-(4-hydroxyfenyl)propionové.

8 Závěr

Tato práce se zaměřila na změření vasorelaxačního účinku isoflavonoidů genistinu a genisteinu a jejich metabolitu 4-etylfenolu. Pokusy probíhaly *in vitro* na izolovaných aortálních kroužcích potkana.

Naše experimenty přinesly tyto závěry:

- Genistein navodil přibližně 80% relaxaci prekontrahované aorty, $EC_{50} = 2,903 \cdot 10^{-5}$ M.
- Genistin, glykosid genisteinu, navodil jen částečnou relaxaci NA prekontrahované aorty, $EC_{50} = 4,045 \cdot 10^{-4}$ M. Nízká účinnost genistinu je pravděpodobně dána přítomností cukru v molekule, po metabolizaci střevní mikroflórou by byla patrně vyšší.
- 4-etylfenol v nižších koncentracích vyvolal dokonce nižší účinek než kontrola DMSO, ve vyšších koncentracích vyvolal jen částečnou vasorelaxaci.

9 Literatura

Akiyama T et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 1987;262:5592-5.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics* 2001;90:155-77.

Catravas J. *Vascular endothelium: Receptors and transduction mechanisms*. Springer Science & Business Media 2013:308.

Coldham NG et al. Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism. *Xenobiotica* 2002;32:47.

Čihák R. *Anatomie 3. 2., upr. a dopl. vyd.* Praha: Grada 2004:673.

Dixon RA, Ferreira D. Genistein. *Phytochemistry* 2002;60:205-11.

Farina HG, Pomies M, Alonso DF, Gomez DE. Antitumor and antiangiogenic activity of soy isoflavone genistein in mouse models of melanoma and breast cancer. *Oncol Rep* 2006;16:885-91.

Fortier A, Gullapalli V, Mirshams RA. Review of biomechanical studies of arteries and their effect on stent performance. *IJC Heart & Vessels* 2014;4:12-18.

Fotsis T et al. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 1995;125 (3 Suppl):790S-797S.

Frankenfeld CL. O-desmethylangolensin: the importance of equol's lesser known cousin to human health. *Adv Nutr.* 2011;2:317-24.

Ganai AA, Faroqi H. Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother* 2015;76:30-38.

Hamdy SM, Latif AKMA, Drees, EA, Soliman, SM. Prevention of rat breast cancer by genistin and selenium. *Technology and Industrial Health* 2012;28:746-57.

Hammad HM, Abdalla SS. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: Structure-Activity relationship *Gen. Pharmac* 1997;28:769.

Hudák R, Kachlík D. *Memorix anatomie*. Praha: Triton 2013, 605.

Choi EJ, Kim T, Lee MS. Pro-apoptotic effect and cytotoxicity of genistein and genistin in human ovarian cancer SK-OV-3 cells. *Life Sciences* 2007;80:1403-8.

Chung MJ et al. Water-soluble genistin glycoside isoflavones up-regulate antioxidant metallothionein expression and scavenge free radicals. *J Agric Food Chem* 2006;54:3819-26.

Junqueira LCU, Carneiro J, Kelley RO. *Základy histologie*. 7. vyd. Jinočany: H&H 1997:502.

Karásek D, Vaverková H. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*. Březsko: Solen 2004;9:450-3.

Kato K et al. Suppressive effects of dietary genistin and daidzin on rat prostate carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 2000;97:786-91.

Katzung BG. *Základní a klinická farmakologie*. Vyd. v ČR 2., v H & H 2. Praha: H & H 2006:1106.

Kaufman PB, Duke JA, Brielmann H, Boik J, Hoyt JE. A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones genistein and daidzein: Implications for human nutrition and health. *J Altern Complement Med* 1997;3:7-12.

Konrádová V, Uhlík J, Vajner L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H 2000:291.

Kwon HK, et al., Comparison of oral bioavailability of genistein and genistin in rats, Int J Pharm 2007;337:148-54.

Langmeier M. Základy lékařské fyziologie. Praha: Grada Publishing 2009:320.

Li H, Wang L, Qu S. Phytoestrogen genistein decreases contractile response of aortic artery in vitro and arterial blood pressure in vivo. Pharmacol Sin 2004;3:313–6.

Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. Farmakologie a toxikologie. Vyd. 1. české. Praha: Grada 2002:694.

Lüllmann-Rauch R. Histologie. Praha: Grada 2012:556.

Martínek J, Vacek Z. Histologický atlas. Praha: Grada 2009:134.

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev 2000;52:675.

Milheiro J, Filipe-Ribeiro L, Vilela A, Cosme F, Nunes, FM. 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-ethylcatechol in red wines: Microbial formation, prevention, remediation and overview of analytical approaches. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2017:1-25.

Najmanová I. Vliv polyfenolických látek na hladký cévní sval. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2017:183 s.

Novýsedláková A. Účinky vybraných izoflavonoidů in vitro na izolované aorte potkana. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2017:92 s.

Pešková H. Účinky vybraných flavonoidů na izolovaných aortálních kroužcích potkana. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové 2017:43 s.

Pilšáková L, Riečanský I, Jagla F. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res* 2010;59:651-64.

Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 2000;Vol. 57, No. 2:135-55.

Wang Q, Ge X, Tian X, Zhang Y, Zhang J, Zhang P. Soy isoflavone: The multipurpose phytochemical (Review). *Biomed Rep* 2013;1:697-701.

Russo M et al. Understanding genistein in cancer: The „good“ and the „bad“ effects: A review. *Food Chem* 2016;196:589-600.

Rüfer CE, Kulling SE. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. *J Agric Food Chem*. 2006;54:2926-31.

Setchell KDR, Cassidy A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 1999;129:758.

Shellnut SR, Cimino CO, Wiggins PA, Ronis MJJ, Badger TM. Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *Am J Clin Nutr* 2002;76:588-594.

Spagnuolo C et al. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Adv Nutr*;6:408-19.

Spilková J. *Farmakognozie*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum 2016:348.

Squadrito F et al. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilatation in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2002;163:339-47.

Takehiko U, Toda T, Tsuji K, Ishida H. Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin and glycitin. *Biol Pharm Bull* 2001;24:368-72.

Tanwar B, Modgil R. Flavonoids: Dietary occurrence and health benefits. *Spatula DD*. 2012;2:59-68.

Taylor SG et al. Endothelium-dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. *Br J Pharmacol* 1988;94:853-63

Thomas B, Sumam, KF. Blood flow in human arterial system - a review. *Procedia Technology* 2016;24:339-46.

Trojan S. *Lékařská fyziologie*. 3., dopl. a rozš. vyd. Praha: Grada 1999, 612 s. ISBN 80-7169-788-5. s. 188-190 192-194.

Vajner L, Uhlík J, Konrádová V. *Lékařská histologie II.: Mikroskopická anatomie*. Praha: Karolinum 2018:174.

Wakai K, Egami I, Kato K, Kawamura T, Tamakoshi A, Lin Y. Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. *Nutr Cancer* 1999;33:139-45.

Wang H et al. Mechanisms underlying biochanin A-induced relaxation of the aorta differ between normotensive and hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2006;33:802-4.

Widmaier EP, Raff H, Strang KT. *Vander's human physiology: the mechanisms of body function*. Fourteenth edition. New York: McGraw-Hill Education 2016:697.

Yang Z, Kulkarni K, Zhu W, Hu M Bioavailability and pharmacokinetics of genistein: mechanistic studies on its ADME. *Anticancer Agents Med Chem* 2012;12:1264-1280.

Elektronické zdroje

Púzserová A. Zdravé endotelové bunky-cesta za zdravším životom. Posterus [serial online] 2016; 9(1):1. 25.1.2016. Portál pre odborné publikovanie. In: Posterus. Dostupné na URL: <http://www.posterus.sk/?p=18309>. Prístup 23. 4. 2018.