

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie



Vliv polyfenolických látek na vaskulární systém

Habilitační práce

(soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

Poděkování

Děkuji všem, kteří přispěli k vzniku této habilitační práce. Zejména kolegům z Výzkumné skupiny kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie, **prof. Přemyslu Mladěnkovi**, **Dr. Marii Vopršalové** a **prof. Radomíru Hrdinovi**. Pojí mě s nimi nejen společná práce, ale i dlouholeté přátelství. Díky patří také bývalým i současným postgraduálním studentům **Dr. Ivetě Nejmanové**, **Mgr. Thomasu Migkosovi** a **Mgr. Patricii Dias**. Zvláštní dík patří paní **Ludmile Latýnové** z Lékařské fakulty v Hradci Králové a panu **Pedrovi Santamaria Ferrer** z Lékařské fakulty University Valencia. Naučili mě mít ráda experimentální práci a předali mi mnoho užitečných laboratorních dovedností i rad do života.

Obsah

Použité zkratky	4
1. Úvod	7
2. Vaskulární hladký sval ve vasokonstrikci a vasodilataci	8
2.1. Vápenaté ionty	10
2.2. Proteinkináza C	14
2.3. Systém RhoA/ROCK	17
2.4. Proteinkináza A	20
2.5. Proteinkináza G	22
3. Endotel ve vasodilataci a vasokonstrikci	24
3.1. Vasodilatace závislá na endotelu	25
3.1.1. NO	25
3.1.2. Další EDRF	27
3.2. Vasokonstrikce závislá na endotelu	30
3.2.1. Endothelin 1	31
3.2.2. Další EDCF	32
3.2.3. Faktory podporující vasokonstrikci závislou na endotelu	33
4. Iontové kanály a ATPázy	35
4.1. Přehled iontových kanálů	35
4.2. Součinnost iontových kanálů	37
4.3. Vápníkové jiskry a vápníkové vlny	38
5. Vasoaktivní látky	39
6. Seznam předkládaných publikací a podíl na jejich vzniku	43
7. Souhrn výsledků a komentáře k předkládaným publikacím	44
7.1. Vasodilatační účinky metabolitů kvercetinu	45
7.2. Vasodilatační účinky isoflavonů	59
7.3. Vasodilatační účinky flavonolignanů silymarinu	65
7.4. Vasodilatační účinky parentního kvercetinu	67
7.5. Zhodnocení dosažených výsledků	69
8. Shrnutí, probíhající práce a možné směry do budoucna	74
Použitá literatura	77
Přílohy	

Použité zkratky

ABC	proteiny ABC, z angl. <i>ATP binding cassette</i>
AC	adenylátcykláza
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ADP	adenosindifosfát
AKAPs	proteiny kotvící kinázu A, z angl. <i>A-kinase anchoring proteins</i>
ANP	natriuretický peptid A
ATP	adenosintrifosfát
BH₄	tetrahydrobiopterin
BK_{Ca}	velký vápníkem aktivovaný draslíkový kanál, z angl. <i>big calcium-activated potassium channel</i>
BNP	natriuretický peptid B
CaMK	kalcium-kalmodulin dependentní protein kináza, z angl. <i>calcium-calmodulin-dependent protein kinase</i>
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
Ca_v	napětově řízený vápníkový kanál, z angl. <i>voltage-gated calcium channel</i>
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CGRP	z angl. <i>calcitonin gene-related peptide</i>
cIMP	cyklický inosinmonofosfát
Cl_{Ca}	vápníkem aktivovaný chloridový kanál, z angl. <i>calcium-dependent chloride channel</i>
CNP	natriuretický peptid C
COX	cyklooxygenáza
CPI-17	z angl. <i>C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor</i>
cPLA₂	cytosolická fosfolipáza A ₂ , z angl. <i>cytosolic phospholipase A₂</i>
DAG	diacylglycerol
ECEs	endothelin konvertující enzymy, z angl. <i>endothelin converting enzymes</i>
EDH	hyperpolarizace závislá na endotelu, z angl. <i>endothelium-dependent hyperpolarization</i>
EDRF	endoteliální relaxační faktory, z angl. <i>endothelium-derived relaxing factors</i>
EETs	epoxyeikosatrienové kyseliny
eNOS	endoteliální NO syntáza
EPAC	výměnný faktor přímo aktivovaný cAMP, z angl. <i>exchange factor directly activated by cAMP</i>
ERM	proteiny ERM, z angl. <i>ezrin-radixin-moesin</i>
ET-1	endothelin 1
GAP	protein urychlující GTPázu, angl. <i>GTPase-accelerating protein</i>
GDI	inhibitor disociace guaninu, z angl. <i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	guanosindifosfát
GEF	výměnný faktor pro guanin, z angl. <i>guanine nucleotide-exchange factor</i>
GTP	guanosintrifosfát
GPOR	membránový receptor pro estrogeny, z angl. <i>G protein-coupled estrogen receptor</i>
15-H-11,12-EETA	kyselina 15(S)-hydroxy-11,12-epoxyeikosatrienová
20-HETE	kyselina 20-hydroxyeikosatetraenová
HSP90	protein teplotního šoku, z angl. <i>heat shock protein</i>
5-HT	serotonin
IK_{Ca}	střední vápníkem aktivovaný draslíkový kanál, z angl. <i>intermediate-conductance calcium-activated potassium channel</i>

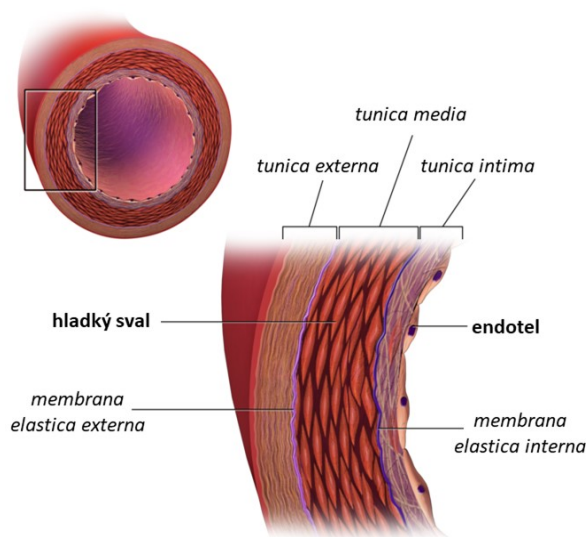
IP₂	inositol 1,4-bisfosfát
IP₃	inositol-1,4,5-trifosfát
IP₃R	receptor pro inositol-1,4,5-trifosfát
iPLA₂	na kalcium nezávislá fosfolipáza A ₂ , z angl. <i>calcium-independent phospholipase A₂</i>
K_{ATP}	draslíkový kanál řízený ATP
K_{ir}	dovnitř usměrněný draslíkový kanál, z angl. <i>inward-rectifier potassium channel</i>
K_v	napěťově řízený draslíkový kanál, z angl. <i>voltage-gated potassium channel</i>
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LIM	kináza LIM
L-NAME	inhibitor NO syntázy, L-N ^G -nitroargininmethylester
15-LOX	15-lipooxygenáza
mDia	protein mDIA, efektor Rho GTPáz
MEGJ	myoendoteliální skulinová spojení, z angl. <i>myoendothelial gap junctions</i>
MLC	lehký myozinový řetězec, z angl. <i>myosin light chain</i>
MLCK	kináza lehkého myozinového řetězce, z angl. <i>myosin light chain kinase</i>
MLCP	fosfatáza lehkého myozinového řetězce, z angl. <i>myosin light chain phosphatase</i>
MYPT1	podjednotka lehkého myozinového řetězce, z angl. <i>myosin phosphatase target subunit</i>
Na⁺/K⁺ ATPáza	sodno-draselná pumpa
NCX	sodno-vápenatý výměník
NO	oxid dusnatý
NOSIP	protein interagující s endoteliální NO syntázou, z angl. <i>eNOS interacting protein</i>
NOSTRIN	induktor přesunu endoteliální NO syntázy, z angl. <i>eNOS traffic inducer</i>
ODQ	blokátor solubilní guanylátcyklázy, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on
Orai1	vápníkový kanál aktivovaný uvolněním vápenatých iontů, angl. <i>calcium release-activated calcium channel protein 1</i>
PDE	fosfodiesteráza, z angl. <i>phosphodiesterase</i>
PECAM-1	adhesivní molekula krevních destiček a buněk endotelu, z angl. <i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
pGC	membránová guanylátcykláza, z angl. <i>particulate guanylate cyclase</i>
PGF_{2α}	prostaglandin F _{2α}
PGI₂	prostacyklin
PI₃K	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kináza, z angl. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PIP₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát, z angl. <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PIP₃	fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát, z angl. <i>phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i>
PKA	proteinkináza A, syn. cAMP-dependentní proteinkináza
PKC	proteinkináza C
PKG	proteinkináza G, syn. cGMP-dependentní proteinkináza
PLA₂	fosfolipáza A ₂ , z angl. <i>phospholipase A₂</i>
PM	plazmatická membrána
PMCA	ATPáza PMCA, z angl. <i>Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase</i>
PVAT	perivaskulární tuková tkáň, z angl. <i>perivascular adipose tissue</i>
PVP	polyvinylpyrrolidon
receptor AT	receptor pro angiotenzin II
receptor ET_A	receptor pro endothelin 1

receptor ET_B	receptor pro endothelin 1
receptor IP₁	receptor pro prostacyklin
receptor TP	receptor pro tromboxan A ₂
receptor RyR	receptor pro ryanodin
RhoA	malá GTPáza z Ras nadrodiny, z angl. <i>Ras homolog family member A</i>
ROC	kanál řízený receptorem, z angl. <i>receptor-operated channel</i>
ROCK	kináza ROCK, z angl. <i>Rho-associated protein kinase</i>
S100A1	vápník vážící protein, z angl. <i>S100 calcium-binding protein A1</i>
SERCA	ATPáza SERCA, z angl. <i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
SERMs	selektivní modulátory estrogenových receptorů, z angl. <i>selective estrogen receptor modulators</i>
sGC	solubilní guanylátcykláza
SHR	spontánně hypertenzní potkan, z angl. <i>spontaneously hypertensive rat</i>
SK_{Ca}	malý vápníkem aktivovaný draslíkový kanál, z angl. <i>small-conductance calcium-activated potassium channel</i>
SMOC	kanál řízený druhým poslem, z angl. <i>second messenger-operated channel</i>
SOC	kanál řízený zásobou vápníku, z angl. <i>store-operated channel</i>
SOCE	vstup vápenatých iontů řízený jejich zásobou, z angl. <i>store-operated calcium entry</i>
SOD	superoxiddismutáza
SR	sarkoplazmatické retikulum
STIM1	proteinový senzor vápníku v sarkoplazmatickém retikulu, z angl. <i>stromal interaction molecule 1</i>
SUR	podjednotka kanálů K _{ATP} vážící deriváty sulfonylmočoviny, z angl. <i>sulphonylurea receptor</i>
11,12,15-THETA	kyselina 11(R),12(S),15(S)-trihydroxyeikosatrienová
TRAM-34	inhibitor kanálů IK _{Ca}
TRP	kanál TRP, z angl. <i>transient receptor potential channel</i>
TxA₂	tromboxan A ₂
U46619	tromboxanový analog prostaglandinu H ₂
UCL-1684	inhibitor kanálů IK _{Ca} a SK _{Ca}
VHS	vaskulární hladký sval
VOC	napěťově řízený kanál, z angl. <i>voltage-operated channel</i>
ZIPK	kináza ZIPK, z angl. <i>zipper interacting protein kinase</i>

1. Úvod

Cévní systém slouží primárně k vedení krve a v ní obsažených látek k tělním orgánům a tkáním a výrazně se podílí na celotělové homeostáze. Dokáže se rychle adaptovat na aktuální potřeby organismu a tato adaptace je založena na souhrně mnoha faktorů jako jsou vasoaktivní signální molekuly, vegetativní inervace, ionty a fyzikální vlivy. Z tlaku krve na cévní stěnu vychází výše arteriálního krevního tlaku. Jeho diastolickou hodnotu primárně ovlivňuje cévní rezistence, která je dána zejména odporovými arteriemi. Obecně cévní rezistence závisí na průměru a délce cévy a viskozitě krve. Pro akutní regulaci je klíčová změna průměru cévy vasokonstrikcí nebo vasodilatací neboť jsou jak velmi rychlé, tak vysoce účinné. Jde o známý fyzikální princip Poiseuilleva zákona, který říká, že objem kapaliny, která proteče trubicí je úměrný čtvrté mocnině jejího průměru.

Arteriální cévní stěna je tvořena několika vrstvami. *Tunica intima* složená z jedné vrstvy endoteliálních buněk je nejbližší lumen a přímo v kontaktu s krví. Následuje *tunica media* tvořená zejména vaskulárními hladkými svaly (VHS) a vnější *tunica externa (adventitia)*, která obsahuje mimo jiné fibroblasty, adipocyty (PVAT, z angl. *perivascular adipose tissue*) schopné produkovat adipokiny a nervová zakončení. Základní strukturu artérie ukazuje obrázek 1.



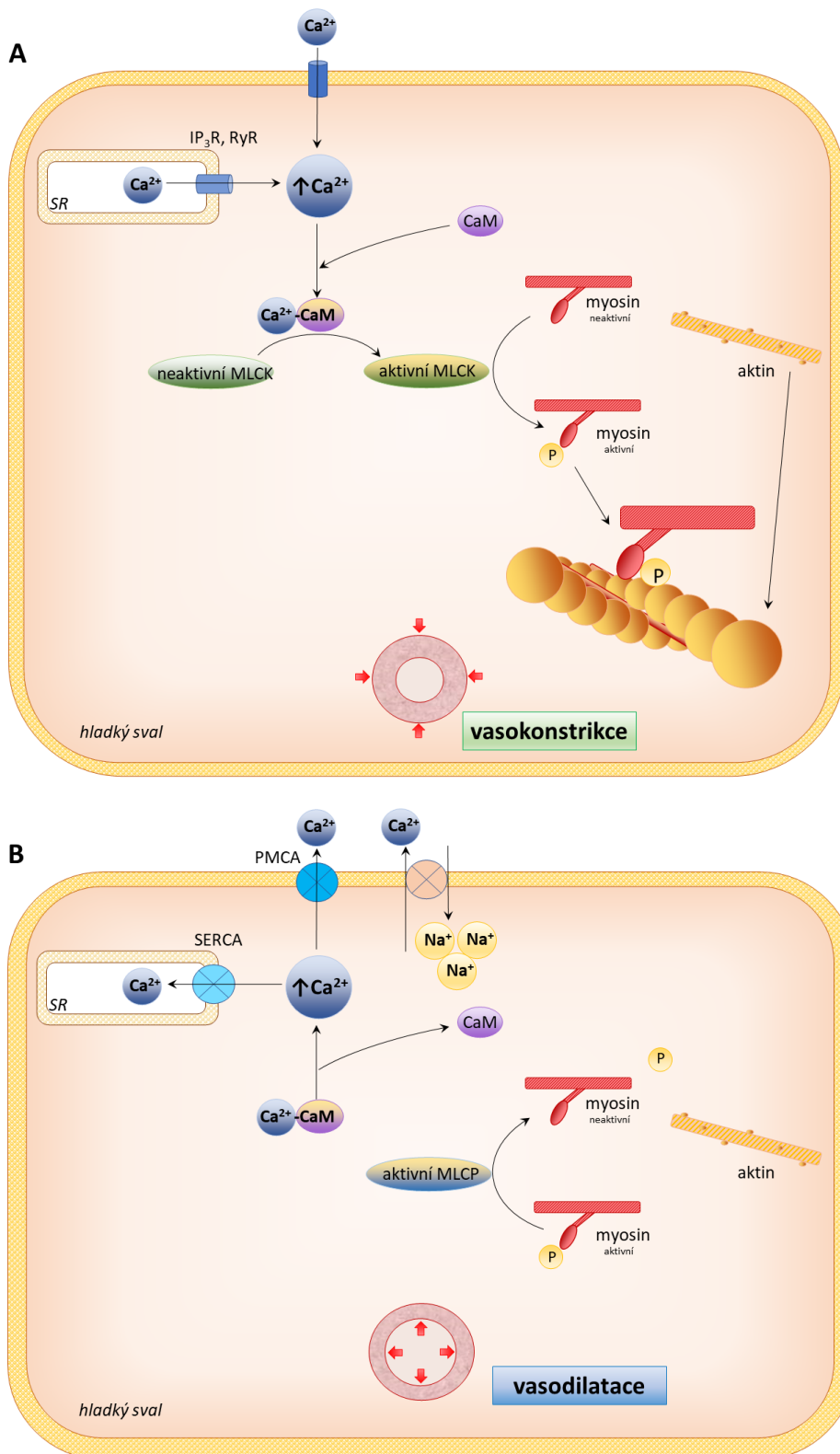
Obr.1 Struktura artérie, kde jsou znázorněny endotel a hladký sval. Upraveno podle [1].

Pro vasokonstrikci a vasodilataci jsou nejdůležitější buňky VHS. Primárně jsou ovlivňovány vasoaktivními látkami a membránovým potenciálem. Důležitou roli mají sousední buňky endotelu, kde přímo vznikají některé vasoaktivní látky, a také se podílejí na změnách membránového potenciálu. Konečnou reakci významně ovlivňují mezibuněčná spojení (běžně

užíván angl. název *gap junctions*) tvořená proteiny konexiny, která umožňují synchronizaci koncentrací iontů a membránového potenciálu sousedních buněk. Propojují mezi sebou jak buňky VHS a endotelu, tak buňky VHS. Cílem následujícího textu je shrnout hlavní informace o průběhu vasokonstrikce a vasodilatace nejprve na úrovni hladkého svalu a dále pak v propojení s úlohou endotelu.

2. Vaskulární hladký sval ve vasokonstrikci a vasodilataci

Základem kontrakce VHS je interakce mezi kontraktilními proteiny aktinem a myozinem za přítomnosti Ca^{2+} . V cytoplazmě se zvýší koncentrace Ca^{2+} dvěma způsoby: nejprve se Ca^{2+} uvolní ze sarkoplazmatického retikula (SR) a následně dojde k vstupu mimobuněčného Ca^{2+} . Ca^{2+} vytvoří komplex s kalmodulem a aktivuje kinázu lehkého myozinového řetězce MLCK (z angl. *myosin light chain kinase*). Dojde k fosforylaci lehkého myozinového řetězce MLC (z angl. *myosin light chain*) na podjednotce MLC_{20} (Ser19) a následnou vazbou aktinu a myozinu začíná svalová kontrakce. Opačně působí defosforylace MLC pomocí fosfatázy MLCP (z angl. *myosin light chain phosphatase*) a disociace komplexu Ca^{2+} -kalmodulem. K poklesu hladiny cytoplazmatického Ca^{2+} (dále $[\text{Ca}^{2+}]_c$) dojde jak vychytáním do SR, tak efluxem mimo buňku Ca^{2+} ATPázou PMCA (z angl. *Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*) a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměníkem (NCX). Děj je dynamický a zásadní je okamžitá lokální koncentrace Ca^{2+} . Průběh vasokonstrikce a vasodilatace shrnuje obrázek 2.



Obr.2 Průběh kontrakce (A) a dilatace (B) vaskulárního hladkého svalu. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

Průběh vasokonstrikce a vasodilatace je provázaně regulován. Mezi hlavní vasokonstrikční faktory patří kromě Ca^{2+} ještě proteinkináza C a systém RhoA/ROCK. Naopak

vasodilatačně působí proteinkinázy A a G. Zcela zásadním faktorem je membránový potenciál svalové buňky. Je to rozdíl potenciálů mezi dvěma stranami plazmatické membrány (PM), který vzniká v důsledku elektrochemického gradientu iontů. Jeho klidová hodnota u buněk VHS je -55 až -40 mV [2]. Depolarizace (snížení rozdílu potenciálů) napomáhá kontrakci, hyperpolarizace působí opačně.

Důležitou úlohu hrají parakrinní působky ze sousedního endotelu, které mohou být vasokonstrikční (endothelin 1, tromboxan A_2/TxA_2), prostaglandin $F_{2\alpha}/PGF_{2\alpha}$) i vasodilatační (NO, epoxyeikosatrienové kyseliny, H_2O_2). Obdobně zřejmě účinkují i působky z PVAT, které jsou méně známy. Kromě toho se v regulaci uplatní látky pocházející z krve (hormony) jako jsou angiotenzin II, vasopresin nebo histamin. Systém významně regulují i fyzikální podněty, zejména napětí cévní stěny (intravaskulární tlak) a teplota. Výsledná reakce je dána souhrou všech zúčastněných faktorů. Velká část z nich zároveň působí na principu zpětné vazby, což způsobuje přechodný charakter odpovědi. I když se jedná o jeden provázaný systém, pro větší přehlednost bude následující text rozdělen na několik signálních cest podle klíčových faktorů: vápenaté ionty, proteinkináza C, systém RhoA/ROCK a proteinkinázy A a G. Role iontových kanálů a ATPáz bude popsána samostatně (viz kapitola 4). V textu bude použita řada navzájem si podobných zkratk. Pokud se zkratka objeví po delší době, bude její význam připomenut.

2.1. Vápenaté ionty

V buňkách VHS existuje výrazný koncentrační gradient pro Ca^{2+} . V klidovém stavu je koncentrace v cytoplazmě ~ 100 nM a vně buňky ~ 3 mM, zhruba třiceti tisíci násobek. Naopak v sarkoplazmatickém retikulu svalové buňky je Ca^{2+} řádově více než v cytoplazmě, odhad v klidovém stavu činí ~ 300 μ M [3]. Zdrojem Ca^{2+} během svalové kontrakce jsou nejen nitrobuněčné zásoby, ale zejména okolní mimobuněčný prostor. Přesun Ca^{2+} zaručuje více typů kanálů.

Nitrobuněčné zdroje Ca^{2+}

Hlavní nitrobuněčnou zásobárnou je SR. Nachází se ve všech typech VHS, větší podíl objemu buňky tvoří ve velkých elastických tepnách [4, 5]. Kapacitu SR zvyšuje Ca^{2+} vážící protein kalsekvestrin. K uvolnění Ca^{2+} dochází po aktivaci kanálů na povrchu SR spojených s receptory IP_3R (endogenní agonista inositol-1,4,5-trifosfát IP_3) a s receptory RyR (agonisté ryanodin a ve vysokých koncentracích kofein). Ryanodin při nanomolární koncentraci kanál zamyká v polootevřeném stavu (probíhá eflux Ca^{2+}) a při mikromolární koncentraci ho zavírá.

Aktivátorem výdeje je i samotný Ca^{2+} . Malé zvýšení koncentrace Ca^{2+} v okolí SR ($\sim 3\mu\text{M}$) vyvolá eflux Ca^{2+} ze SR. Tento děj podpoří agonisté na RyR kanálech a překvapivě také cAMP, opačně působí ionty Mg^{2+} . Nárůst Ca^{2+} v okolí SR tak vyvolá další a další eflux a signál se amplifikuje, což je důležitá součást kalciové signalizace.

Mimobuněčné zdroje Ca^{2+}

Ca^{2+} vstupuje do VHS neustále v rámci bazálního přesunu iontů pomocí kanálů pro divalentní kationty. Tento vstup snižují ionty H^+ (tj. pokles pH). Protože zároveň dochází k odstraňování Ca^{2+} z cytoplazmy do zásob, zejména do SR a mitochondrií, a k efluxu přes PM, bazální přesun iontů nechává buňky VHS v klidovém stavu. Kontrakci VHS vyvolá, pokud je tato rovnováha vychýlena výraznějším vstupem mimobuněčného Ca^{2+} . Může jít jak o fyziologický, tak o patologický děj. Mezi jeho hlavní spouštěče patří vazba vasokonstričního agonisty na receptory na PM aktivující nitrobuněčnou kaskádu vedoucí k otevření Ca^{2+} kanálů, pokles nitrobuněčných zásob Ca^{2+} , výraznější natažení cévní stěny ($\sim 20\%$) nebo změna koncentrací iontů, zejména K^+ . Zásadní je depolarizace PM, která aktivuje napěťově řízené vápníkové kanály Cav. Ve VHS se nacházejí dva základní typy těchto kanálů: T-typ a L-typ. T-vápníkové kanály (jiné označení Cav3.1-3) jsou aktivovány menší depolarizací ($\sim -30\text{ mV}$) a rychle se inaktivují. Z toho vyplývá i jejich název od slova transient (přechodný) [6]. L-vápníkové kanály (jiné označení Cav1.2) se aktivují až silnější depolarizací (např. při vyšším tlaku krve), jsou otevřeny po delší dobu a proudí jimi větší množství Ca^{2+} . Jsou proto nazvány L z angl. *long-lasting* nebo *large* [7].

Vstup extracelulárního Ca^{2+} může probíhat také přes kanály označované jako TRP (z angl. *transient receptor potential channel*) [8]. V minulosti byly označovány podle své aktivace jako ROC (*receptor-operated*), SOC (*store-operated*), VOC (*voltage-operated*), SMOC (*second messenger-operated*) a SAC (*stretch-activated*), od tohoto označení se v posledních letech upouští. Rozeznáváme šest typů kanálů TRP (C, V, M, P, A a ML). Většina je propustná pro Ca^{2+} a v menší míře pro Na^+ . Kanály TRPM4 a TRPM5 jsou Ca^{2+} aktivované, ale pro Ca^{2+} nepropustné, oba propouštějí Na^+ a K^+ podle polarity membrány [9-12]. Kanály TRP se aktivují několika způsoby: 1) účinkem vasokonstričního agonisty přes příslušné membránové receptory (např. noradrenalin a jeho α_1 receptory). Komunikace mezi agonistou a kanálem probíhá cestou $G_q/\text{PLC}/\text{IP}_3/\text{DAG}$ (viz dále) [13]; 2) poklesem zásob Ca^{2+} v buňce (SOCE, z angl. *store-operated calcium entry*). Za hlavní senzor zásob Ca^{2+} je dnes považován STIM1 [14], který interaguje s kanály typu TRPC a zejména s proteinem Orai1; 3) zvýšením tlaku krve a natažením cévní stěny. Tyto „*stretch-activated*“ kanály se nalézají nejen na VHS, ale i v buňkách endotelu [15]. Řadí se mezi ně TRPV4, TRPV2 [16], TRPC6 [17] a TRPP [10]. Nově se uvažuje i o komunikaci mezi SR

a PM pomocí *nanojunctions*, která by rovněž regulovala přesun Ca^{2+} [18, 19]. Konečnou odpověď výrazně ovlivní velikost podnětu, např. smykové tření dané fyziologickým prouděním krve působí vasodilatačně, podobně mírné natažení (do ~5-10 %).

Otevřené Ca^{2+} kanály se podílejí na své vlastní inaktivaci na principu negativní zpětné vazby. Již úvodní vstup Ca^{2+} po otevření kanálů $\text{Ca}_v3.2$ spouští aktivaci draselných kanálů BK_{Ca} (z angl. *big calcium-activated potassium channel*, jiné označení $\text{K}_{\text{Ca}1.1}$) na PM [20], která vede k efluxu K^+ , hyperpolarizaci a inaktivaci napěťově řízených vápníkových kanálů.

Účinky Ca^{2+}

Zvýšená koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_c$ je zásadním spouštěčem vasokonstrikce, podstatné při ní jsou amplifikace signálu (tj. přísun dalšího Ca^{2+}) a navození depolarizace PM. Ca^{2+} působí buď přímo nebo vázaně na proteiny, zejména kalmodulin. Neobvyklý není ani obojí způsob regulace u téhož děje.

- přímý vliv jako Ca^{2+} :
 - v menší koncentraci ~1 μM aktivuje receptory RyR na SR [21, 22]
 - aktivuje kanály TRPM4 a TRPM5 na PM, influx Na^+ podpoří depolarizaci a zvýší aktivitu kanálů $\text{Ca}_v1.2$ (tj. L-tyt) [23, 24]
 - inaktivuje napěťově řízené draslíkové kanály K_v na PM, což pomáhá udržet depolarizaci VHS [25]
- jako Ca^{2+} -kalmodulin:
 - mění konformaci a tím aktivuje kinázu MLCK. Ta fosforylací MLC spouští základní mechanismus svalové kontrakce [3, 26]
 - aktivuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát-3-kinázu PI_3K (z angl. *phosphatidylinositol-3-kinase*) [27], která následně aktivuje systém RhoA/ROCK (bude zmíněn dále)
 - váže se na kalponin a brání jeho vazbě na aktin. Aktin se tak může vázat na myozin
 - aktivuje kalcineurin (proteinfosfatázu 2B) a ten inhibuje kanál K_{ATP} na PM. Tento kanál přispívá ke klidovému potenciálu [28]
 - aktivuje kalcium-kalmodulin-dependentní protein kinázu CaMK (z angl. *calcium-calmodulin-dependent protein kinase*), která pak aktivuje receptory IP_3R [29] a RyR na SR (platí pro nM koncentrace Ca^{2+}) [21, 30, 31]
- jako Ca^{2+} -S100A1 aktivuje receptory RyR na SR a kanály $\text{Ca}_v1.2$ na PM [32, 33]

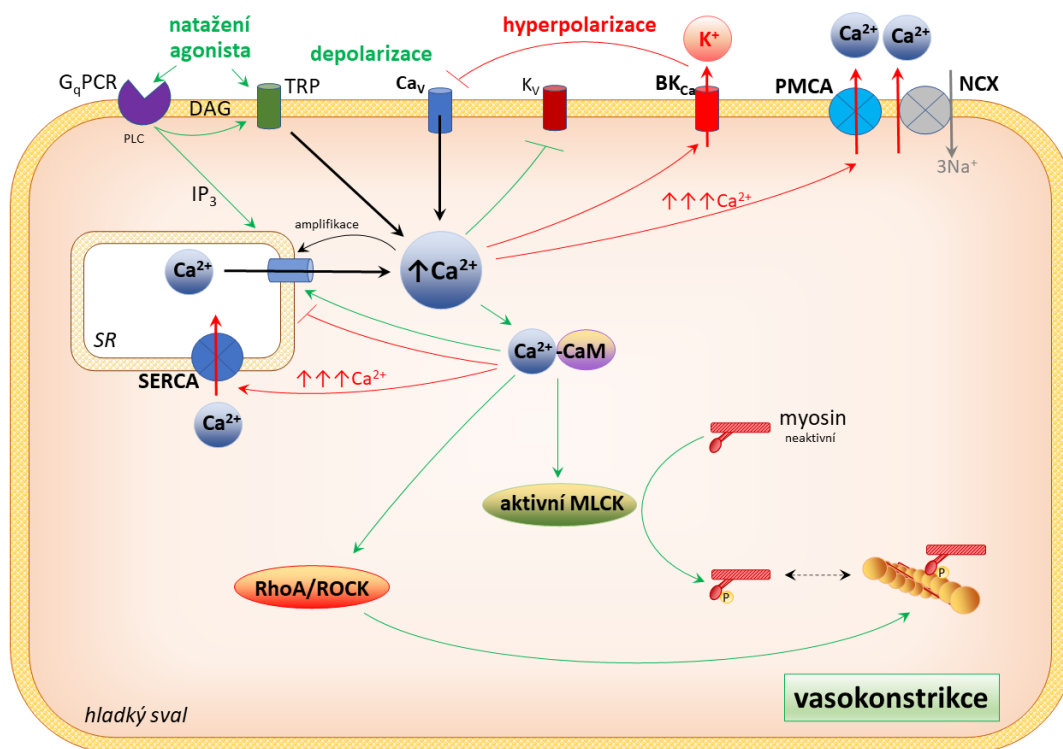
Dualita účinku Ca^{2+}

Zvýšení koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_c$ primárně působí provasokonstrikčně pomocí výše zmíněných mechanismů, ale od určité hodnoty (~jednotky-desítky μM , liší se u jednotlivých receptorů a kanálů, hodnota není jednoznačně určena) vasokonstrikci tlumí. Hlavní je vliv na iontové kanály a návrat koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_c$ ke klidové hodnotě:

- přímo jako Ca^{2+} :
 - aktivuje draslíkové kanály BK_{Ca} na PM. Jsou to nejdůležitější kanály pro eflux K^+ a navození hyperpolarizace PM [34]
 - touto hyperpolarizací zprostředkovaně inaktivuje kanály $\text{Ca}_v1.2$ na PM, ustává přísunu extracelulárního Ca^{2+}
 - inaktivuje vápníkové kanály $\text{Ca}_v3.3$ (tj. T-typ) na PM [35]
 - aktivuje kinázu CaMK, která na SR aktivuje ATPázu SERCA (z angl. *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*) tak, že fosforylací (Thr17) oddělí od SERCA regulační protein fosfolamban [36].
- jako Ca^{2+} -kalmodulin:
 - při vyšší koncentraci $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (~3-10 μM) inaktivuje kanály RyR na SR [21, 30]. Podobně účinkuje jiný protein vážící vápník, sorcin [18]
 - aktivuje ATPázu PMCA na PM [37]. Na odsunu Ca^{2+} se podílí i sodno-vápenatý výměník NCX. Jeho činnost je dána transmembránovým gradientem pro oba ionty a membránovým potenciálem, za určitých okolností může dokonce probíhat i influx Ca^{2+} . Výměník NCX se více uplatní v buňkách s náhlým a výrazným zvýšením koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_c$, typicky v neuronech po akčním potenciálu. Ve VHS má menší roli, ale jeho význam by mohl být větší za patologické situace, např. hypertenze [38]

Část cytoplazmatického Ca^{2+} se přesouvá do mitochondrií. Tato regulace koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_c$ je méně jasná. Její význam zřejmě stoupá, pokud je abnormálně vysoká, včetně patologických stavů (ateroskleróza) [39].

Roli Ca^{2+} shrnuje obrázek 3.



Obr.3 Role iontů Ca^{2+} ve vasokonstrikci. Zeleně jsou znázorněny hlavní děje spojené s vasokonstrikcí, červeně děje spuštěné vyšší koncentrací Ca^{2+} , které působí proti vasokonstrikci. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

2.2. Proteinkináza C

Proteinkináza C (PKC) je široce rozšířená cytoplazmatická serin/threoninová kináza s řadou isoform, ve VHS má největší význam $\text{PKC}\beta$ [40]. PKC aktivují především extracelulární vasokonstrikční látky prostřednictvím příslušného receptoru G_q na PM (např. endothelin 1, angiotenzin II, vasopresin, noradrenalin, 5-HT). Aktivaci PKC vyvolávají také forbolové estery, které se přímo váží na PKC [41], nebo mechanická stimulace - přes „stretch-sensitive“ receptory, hlavními kandidáty jsou receptory AT_1 pro angiotenzin II typu G_q /aktivace PKC_γ /TRPM4, TRPC [42, 43].

Aktivace PKC

Po vazbě agonisty na receptor G_q dojde k oddělení alfa podjednotky G-proteinu, v PM se aktivuje fosfolipáza C (PLC) a ta hydrolyzuje membránový fosfolipid fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) na diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3). Obdobně se aktivuje fosfolipáza D a hydrolyzuje fosfatidylcholin na DAG a na cholin. PIP_2 se také může fosforylovat fosfatidylinositol-3-kinázou (PI_3K) za vzniku dalšího druhého posla, fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu (PIP_3). Kináza PI_3K již byla zmíněna - je aktivována komplexem

Ca²⁺-kalmodulin a přispívá k aktivaci RhoA. PLC je naopak inaktivována proteinkinázami A a G (viz kapitoly 2.4 a 2.5) [44].

DAG je lipofilní, zůstává v PM, kde za účasti fosfatidylserinu a Ca²⁺ aktivuje PKC [45]. Součástí aktivace je fosforylace PKC kinázou a autofosforylací a translokace PKC k PM, na které se podílejí annexiny [46] a další proteiny [47]. Trochu podceňovanou cestou aktivace PKC jsou její post-translační modifikace oxidací, acetylací nebo nitrací [48]. Zde se uplatňují vasodilatační působky z endotelu, tento účinek je prokázán u H₂O₂ [49] a v případě PKC α [50] a PKC ϵ [51] také u NO. PKC je aktivována i PIP₃ [52].

DAG má další účinky spojené s vasokonstrikcí. Aktivuje kanály TRPC6 na PM, což vede k influxu Ca²⁺ [53]. DAG se pomocí DAG-lipázy mění na kyselinu arachidonovou, která inaktivuje fosfatázu MLCP přímo i prostřednictvím aktivace kinázy ROCK [54]. Kyselina arachidonová kromě toho vzniká i po aktivaci fosfolipázy A₂ (PLA₂) hydrolyzou fosfatidyletanolaminu [55].

Spolu s DAG vzniká IP₃. Je ve vodě rozpustný, difunduje cytosolem, aktivuje receptor IP₃R na povrchu SR a eflux Ca²⁺ [56]. EC₅₀ je odhadována na 1 μ M, což již stačí na vyvolání přechodné svalové kontrakce [57]. Úloha koncentrace [Ca²⁺]_c a amplifikace signálu byly popsány výše. Kromě toho IP₃ aktivuje vápníkový kanál TRPC3 na PM [58]. IP₃ je rychle inaktivován specifickými fosfatázami na inositol 1,4-bisfosfát IP₂ [59].

Účinky aktivní PKC

Působení PKC ve VHS je velmi rozmanité [60]. Obecně se pojí s depolarizací PM, nárůstem koncentrace [Ca²⁺]_c a vasokonstrikcí.

- vliv na iontové kanály v PM
 - aktivuje vápníkové kanály Ca_v1.2 přímo fosforylací i nepřímo prostřednictvím aktivované tyrosinkinázy SRC. Je zajímavé, že kanály Ca_v1.2 dokáže aktivovat i přímo PI₃K, která aktivuje PKC [61]
 - inhibuje K⁺ kanály, zejména BK_{Ca} [62-64] a K_v [65, 66], ale i K_{ATP} [28, 67, 68]. To podporuje depolarizaci a sekundárně také aktivitu napěťově řízených kanálů v PM, zejména Ca_v1.2
 - působí na kanály TRP. Tento vliv není dobře znám a může být i inhibiční (viz dále možný vliv na TRPC6 a TRPC7)
- inhibicí fosfatázy MLCP brání defosforylaci MLC₂₀ [69, 70]. MLCP fosforyluje přímo na podjednotce MYPT1 (z angl. *myosin phosphatase target subunit*) a mimo to

fosforylací (Thr38) aktivuje fosfopeptid CPI-17 (z angl. *C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor*), který také inhibuje MLCP. Podobně účinkuje kináza ROCK

- fosforyluje proteiny, které v nefosforylované formě váží aktin, jako jsou kalponin a kaldesmon [71]. Uvolněný aktin se může vázat na myozin.
 - na fosforylaci kalponinu se mohou podílet další kinázy [72]. Zároveň autofosforylace PKC je kalponin-dependentní [73]. Kalponin dokonce dokáže *in vitro* aktivovat PKC a knock-down genu pro kalponin inhiboval PKC-dependentní kontrakci. Fosforylace kalponinu je závislá na komplexu Ca^{2+} -kalmodulin [60, 71, 74, 75]
- inhibuje Na^+/K^+ ATPázu [76] a aktivuje výměník Na^+/H^+ na PM [77, 78]. Vstup Na^+ podporuje depolarizaci, alkalizace cytoplazmatického pH obecně vede ke kontrakci [79]. Možná aktivuje i výměník NCX, ale přímý vliv PKC byl dosud prokázán jen v nevasculární tkáni [80]
- inhibuje solubilní guanylátcyklázu (tj. vznik cGMP) a tím vasodilataci navozenou NO [81]

Dualita účinku PKC

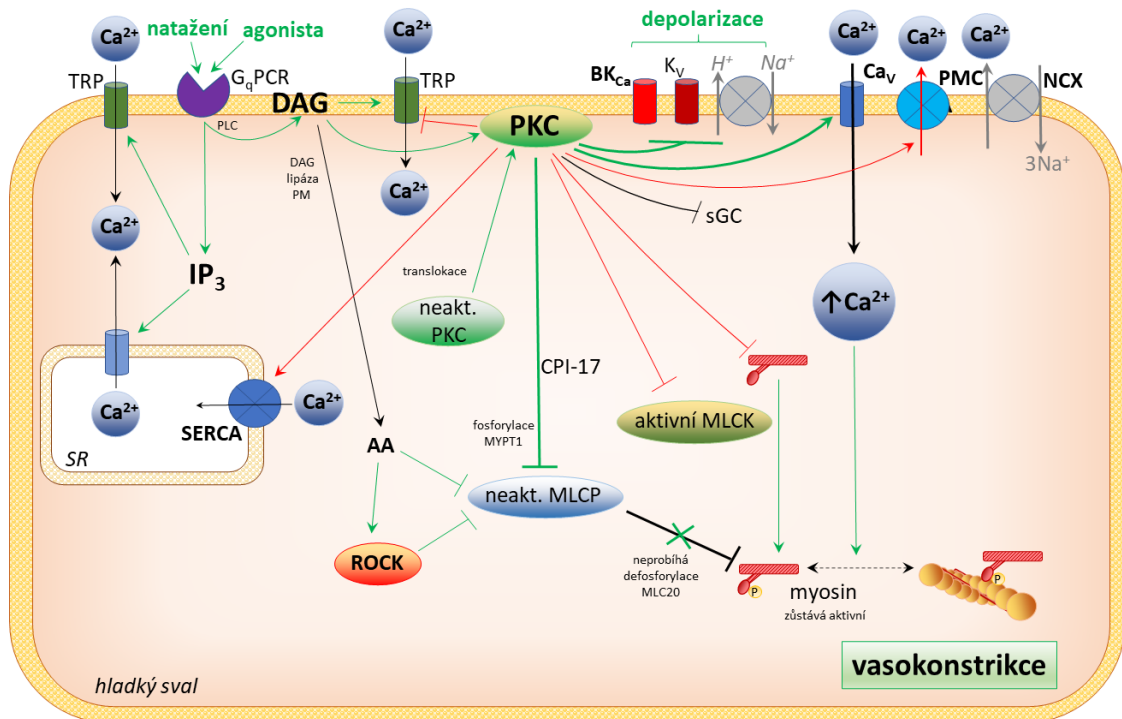
Aktivaci PKC chápeme jako provasokonstrikční, ale působí i opačně, což přispívá k přechodnému charakteru kontrakce:

- aktivuje ATPázy PMCA na PM a SERCA na SR, obě snižují koncentraci $[Ca^{2+}]_c$ [5, 69]
- inaktivuje kinázu MLCK a fosforylací MLC_{20} brání interakci s aktinem [82, 83]
- usnadňuje disociaci $G_{\alpha i}$ -GTP od adenylátcyklázy a tím ukončí její inhibici [84]
- stimuluje eNOS a produkci vasodilatačního NO v endotelu (bude vysvětleno dále) [85]
- stimuluje sekreci natriuretického peptidu C (CNP) [86]
- inhibuje kanály TRPC6 a TRPC7 na PM, které se účastní SOCE (z angl. *store-operated calcium entry*) - zjištěno na buňkách HEK293 [87], důkaz pro VHS chybí
- možná zvyšuje syntézu GAP, který se podílí na inaktivaci provasokonstrikčního RhoA-GTP [88] (viz kapitola 2.3)

Roli PKC shrnuje obrázek 4.

Farmakologicky zajímavá by do budoucna mohla být inhibice PKC. Starší látky, jako je staurosporin, účinkují nespecificky na všechny izoformy. Perspektivnější by mohly být specifické inhibitory jako ruboxistaurin, který inhibuje PKC_{β} a je zkoušen při léčbě diabetické retinopatie [89], nebo midostaurin při léčbě akutní myeloidní leukemie [90]. Potenciálně

zajímavá je inhibice PKC pomocí některých antioxidantů (vitamin E, sloučeniny selenu, kurkumin) [91-93], glutationu (neredoxní mechanismus) [94] či analogů tamoxifenu [95].



Obr.4 Role proteinkinázy C ve vasokonstrikci. Zeleně jsou znázorněny hlavní děje spojené s vasokonstrikcí, červeně děje, které působí proti vasokonstrikci. Je znázorněn i vliv na solubilní guanylátcyklázu a kinázu ROCK. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

2.3. Systém RhoA/ROCK

RhoA (Ras homolog family member A) je malá GTPáza z Ras nadrodiny. Vývojově je velmi stará a má více funkcí včetně regulace transkripce a buněčného dělení. Ve VHS je hojně zastoupená a významně se účastní vasokonstrikce. RhoA funguje na stejném principu jako ostatní malé GTPázy. V neaktivním stavu RhoA-GDP se nachází v cytoplasmě vázaná na inhibitor GDI (z angl. *guanine nucleotide dissociation inhibitor*). K aktivaci dochází dvěma hlavními způsoby: vlivem extracelulárních vasokonstrikčních látek, kdy není nutně zvýšená koncentrace $[Ca^{2+}]_c$, a prostřednictvím zvýšené koncentrace $[Ca^{2+}]_c$ s aktivací kinázy PI_3K [96].

Aktivace RhoA

Extracelulární vasokonstrikční látky (např. endothelin 1, angiotenzin II) se vážou na příslušné membránové receptory typu $G_{12/13}$ a dojde k oddělení alfa podjednotky. RhoA-GDP disociuje od GDI a přesune se k PM [27, 97]. Aktivací faktoru GEF (z angl. *guanine nucleotide-exchange factor*) se vymění GDP za GTP, čímž vzniká aktivní RhoA-GTP. RhoA-GDP je aktivován

také zvýšenou koncentrací $[Ca^{2+}]_c$ prostřednictvím dráhy komplex Ca^{2+} -kalmodulin/ kináza PI_3K . Množství RhoA-GTP je regulováno GAP (z angl. *GTPase-accelerating protein*), který stimuluje GTPázovou aktivitu G-proteinu (α podjednotka je schopna katalyzovat vlastní inaktivaci). Dalším způsobem regulace je fosforylace GDI provasodilatačními proteinkinázami A a G, která inaktivní komplex Rho-GDP-GDI stabilizuje [98].

Aktivní RhoA-GTP se váže na své efektory. Nejdůležitější je cytoplazmatická kináza ROCK (z angl. *Rho-associated protein kinase*), která se tímto aktivuje. ROCK může být aktivována i jinak, zejména kyselinou arachidonovou [99].

Kináza ROCK a její účinky

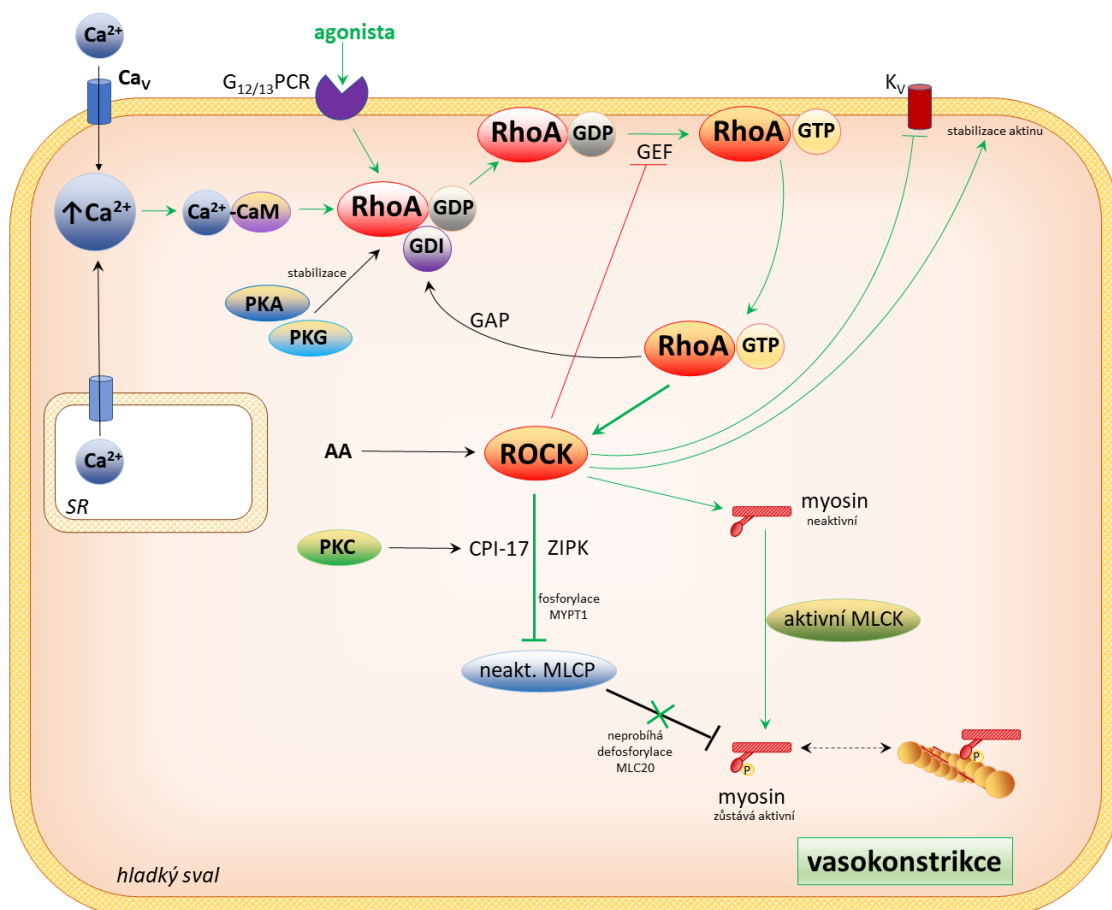
Kináza ROCK je široce rozšířená serin/threoninová kináza, která má dvě formy (ROCK1 a ROCK2). Její aktivace může proběhnout i bez výrazného zvýšení koncentrace $[Ca^{2+}]_c$ [100]. Po aktivaci se ROCK částečně přesouvá k PM. Fosforyluje mnoho substrátů a obecně působí vasokonstrikčně:

- fosforylací podjednotky MYPT1 (Thr695 a Thr853) inaktivuje fosfatázu MLCP a tím brání defosforylaci MLC_{20} [97, 101]. Je to nejdůležitější účinek kinázy ROCK ve VHS a hlavní roli má ROCK2 [102]. Probíhá i nepřímo prostřednictvím aktivace kinázy ZIPK (z angl. *zipper interacting protein kinase*), která fosforyluje MYPT1 (Thr696 a Thr18/Ser19), a prostřednictvím inhibitoru CPI-17, který se aktivuje fosforylací na Thr38 [103]. CPI-17 je aktivován také PKC
- přímo fosforyluje MLC_{20} , což zahajuje svalovou kontrakci [97, 101]
- na PM inaktivuje kanály K_v , tím brání efluxu K^+ a hyperpolarizaci [104]
- má i další méně dobře popsané mechanismy, které jsou spojeny s vasokonstrikcí, jako jsou fosforylace kalponinu [105], kináz LIM 1 a 2 [106, 107], ERM proteinů (ezrin-radixin-moesin) [108] a proteinů mDia (1 a 2) [109]

Systém RhoA/ROCK působí na cévní systém také mimo VHS. Jeho inhibice zvyšuje sekreci vasodilatačního NO v buňkách endotelu [110]. Uplatní se i při nárůstu cévní tuhosti v rámci hypertenze a to prostřednictvím zvýšené exprese provasokonstrikčních proteinů a zvýšení periferní rezistence [111, 112]. V souladu s tím byl popsán větší význam systému RhoA/ROCK u hypertenzních SHR potkanů než u normotenzních zvířat [113, 114]. Inhibice RhoA v tubulárním epitelu ledvin snad snižuje reabsorpci Na^+ , což by také mohlo zprostředkovaně ovlivnit tlak krve a VHS [115].

Dualita účinku RhoA/ROCK

Aktivní kináza ROCK tlumí svou vlastní aktivací tím, že snižuje expresi GEF [116]. Inhibice ROCK naopak snižuje sekreci vasodilatačního acetylcholinu [117] a zvyšuje sekreci vasokonstričního dopaminu [118]. Tyto účinky byly ale popsány mimo cévní systém, důkazy pro VHS zatím chybí. Roli RhoA/ROCK shrnuje obrázek 5.



Obr.5 Role systému RhoA/ROCK ve vasokonstrikci. Zeleně jsou znázorněny hlavní děje spojené s vasokonstrikcí, červeně ty děje, které působí proti vasokonstrikci. Je znázorněno také propojení s proteinkinázami A, G a C a s kyselinou arachidonovou. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

Inhibitory systému RhoA/ROCK jsou farmakologicky zajímavé a v některých zemích již klinicky využívané, např. inhibitor kinázy ROCK fasudil v terapii plicní hypertenze [119]. Zvažují se i další indikace: Raynaudův syndrom nebo zhoršení paměti ve stáří. Inhibiční účinky na systém RhoA/ROCK mají překvapivě statiny, které brání translokaci ROCK k PM [120].

2.4. Proteinkináza A

Proteinkináza A (PKA, syn. cAMP-dependentní proteinkináza) je důležitá serin/threoninová kináza. Je to tetramer složený z dvou regulačních (RI nebo RII) a dvou katalytických (C_α nebo C_β) podjednotek, podle R se rozlišují podtypy PKA I a II. PKA je hlavní intracelulární receptor pro cAMP, který jejím prostřednictvím reguluje řadu důležitých dějů. Na účinku se podílejí AKAPs (z angl. *A-kinase anchoring proteins*), které vážou R (více R II než R I), tím kotví PKA v PM a zároveň váží další komponenty této dráhy, zejména adenylátcyklázu a fosfodiesterázu [121]. Stojí za zmínku, že AKAPs dokážou vázat i další faktory spojené s vasokonstrikcí nebo vasodilatací včetně PKC [122] a v endotelu se podílejí na aktivaci kanálů TRPV4 [123].

Aktivace PKA

PKA je aktivována pomocí cAMP, který vzniká účinkem adenylátcyklázy. K aktivaci tohoto enzymu v PM dochází zejména vlivem extracelulárních vasodilatačních látek, které se na PM váží na příslušný receptor typu G_s (např. isoprenalin, adenosin, prostacyklin). Dojde k oddělení alfa podjednotky ve formě G_s -GTP, stimulací adenylátcyklázy vzniká cAMP (dále uváděno jako AC/cAMP). Aktivita G_s -GTP je ukončena hydrolýzou GTP na GDP vnitřní GTPázovou aktivitou G_s , tento proces je regulován GAP. Množství cAMP je regulováno fosfodiesterázou. Adenylátcykláza může být aktivována i přímo, např. forskolinem.

cAMP způsobí disociaci katalytických C podjednotek z PKA, které následně fosforylují další molekuly. Tento účinek je regulován množstvím regulačních R podjednotek. Čím vyšší je poměr R:C, tím rychleji budou C podjednotky zpět navázány do komplexu R-C [121]. Tvorbu komplexu R-C podporuje přítomnost ATP [124], tím snižuje aktivaci PKA a působí proti vasodilataci. ATP také inaktivuje kanály K_{ATP} , které se podílejí na klidovém potenciálu [28]. Disociaci R-C brání ionty Ca^{2+} , opačně účinkují ionty Mg^{2+} [125]. V této souvislosti je zajímavé, že AKAPs a PKA se nacházejí se v blízkosti kanálů Ca_v [125]. Překvapivě cAMP podporuje výdej Ca^{2+} ze SR za přítomnosti vyššího množství Ca^{2+} ($\sim 3\mu M$) v okolí SR.

cAMP působí i jinak než prostřednictvím PKA. EPAC (z angl. *exchange factor directly activated by cAMP*) je intracelulární senzor cAMP. Jedná se o Ras-like GTPázu, která snad reguluje aktivitu RhoA, kanálů K_{ATP} a nepřímo přes kanály RyR a množství Ca^{2+} i aktivitu kanálů K_{Ca} . Účinek se liší podle typu cévy – v mikrovaskulárním VHS stimuluje RhoA a kontrakci, ve větších arteriích je tomu naopak. Je možné, že ovlivňuje i eNOS v endoteliálních buňkách [126, 127].

Účinky aktivní PKA

Aktivní PKA fosforyluje řadu cílů a obecně se pojí s hyperpolarizací PM, poklesem koncentrace $[Ca^{2+}]_c$, defosforylací MLC a vasodilatací:

- na PM aktivuje kanály BK_{Ca} (jsou aktivovány také cAMP/EPAC) a K_v , dochází k efluxu K^+ . Kanály K_{ATP} se pravděpodobně otevírají až při zvýšení polarity PM [128]
- na SR inhibuje receptory IP_3R a aktivuje ATPázu SERCA fosforylací regulačního proteinu fosfolambanu, který se v této formě od SERCA oddělí [36]
- snižuje afinitu kinázy MLCK ke komplexu Ca^{2+} -kalmodulin a tím i schopnost fosforylovat MLC [129]
- urychlí hydrolyzu aktivní RhoA-GTP na RhoA-GDP, tím inhibuje systém RhoA/ROCK [130]
- fosforylací GDI stabilizuje komplex GDI-RhoA a brání tak aktivaci systému RhoA/ROCK [98]
- inhibicí PLC_β snižuje produkci DAG a IP_3 , tento účinek byl prokázán na hladkém svalu GIT [45], ale možná se uplatní i ve VHS

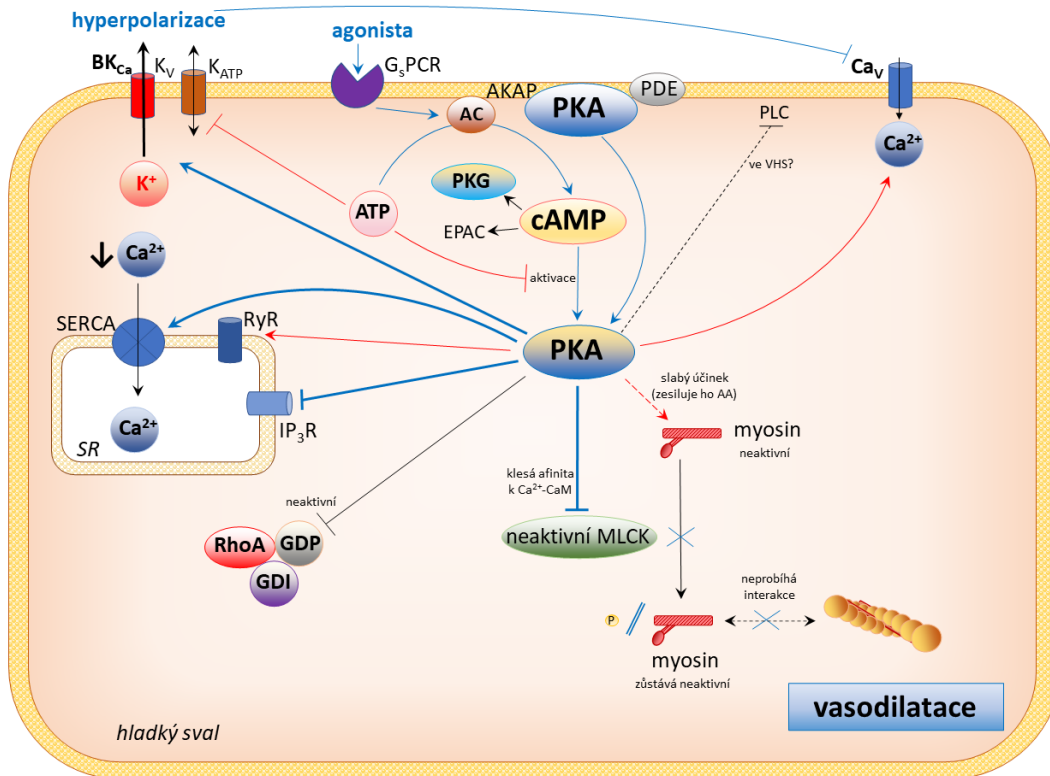
Nabízí se otázka, zda působení zahrnuje také fosfatázu MLCP. Dosud byl prokázán pouze nepřímý účinek prostřednictvím inhibice RhoA/ROCK v koronárních arteriích [131].

Dualita účinku PKA

Aktivní PKA má i provasokonstrikční vliv, kterým omezuje výše popsané účinky:

- na PM aktivuje kanály Ca_v a zvyšuje tak koncentraci $[Ca^{2+}]_c$
- na SR aktivuje kanály RyR (tyto kanály jsou ovlivňovány také cAMP/EPAC, účinek se liší podle typu cévy)
- slabě aktivuje MLC_{20} a stimuluje Mg^{2+} -ATPázovou aktivitu myozinu nezávisle na koncentraci $[Ca^{2+}]_c$. Toto působení potencuje přítomnost μM množství kyseliny arachidonové, která inaktivuje fosfatázu MLCP přímo [54] i prostřednictvím kinázy ROCK. Kyselina arachidonová ale neovlivňuje kinázu MLCK [132]. Na výsledném účinku by se mohly podílet i metabolity kyseliny arachidonové.

Roli PKA shrnuje obrázek 6.



Obr.6 Role proteinkinázy A ve vasodilataci. Modře jsou znázorněny hlavní děje spojené s vasodilatací, červeně děje, které působí proti vasodilataci. Je znázorněn také vliv na další systémy: stabilizace RhoA, aktivace EPAC a aktivace proteinkinázy G, která probíhá při vysoké koncentraci cAMP, a konečně předpokládaný vliv na fosfolipázu C. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

2.5. Proteinkináza G

Proteinkináza G (PKG, syn. cGMP-dependentní proteinkináza) je serin/threoninová kináza. Je složena ze dvou podjednotek. Existují dva typy PKG-I a PKG-II, typ PKG-I se dále rozlišuje na isoformy α a β (PKG-I $_{\beta}$ je aktivována asi 10-krát vyšší koncentrací cGMP, než PKG-I $_{\alpha}$). PKG-I se nalézá v cytoplasmě, PKG-II je díky myristylaci na N-konci zakotvena v PM. V relaxaci VHS má větší význam PKG-I [133], PKG-II má význam v jiných tkáních, např. ve střevě, mozku a v ledvinách [134].

Aktivace PKG

Hlavním aktivátorem PKG je cGMP, který vzniká účinkem dvou typů guanylátcyklázy (GC). Prvním je membránově vázaná pGC aktivovaná natriuretickými peptidy [135]. Známější je intracelulární, tzv. solubilní sGC, kterou typicky aktivuje NO z buněk endotelu. sGC proto bývá nazývána senzorem NO [136]. Množství cGMP je regulováno pomocí fosfodiesterázy. PKG může být aktivována i pomocí cAMP, který účinkuje jako parciální agonista. Potřebná koncentrace je

asi 100-krát vyšší než je tomu u cGMP. Fyziologický význam není jasný, snad souvisí s faktem, že s rostoucí cytoplazmatickou koncentrací cAMP roste i množství cGMP potřebné k aktivaci PKG [134, 137].

Účinky aktivní PKG

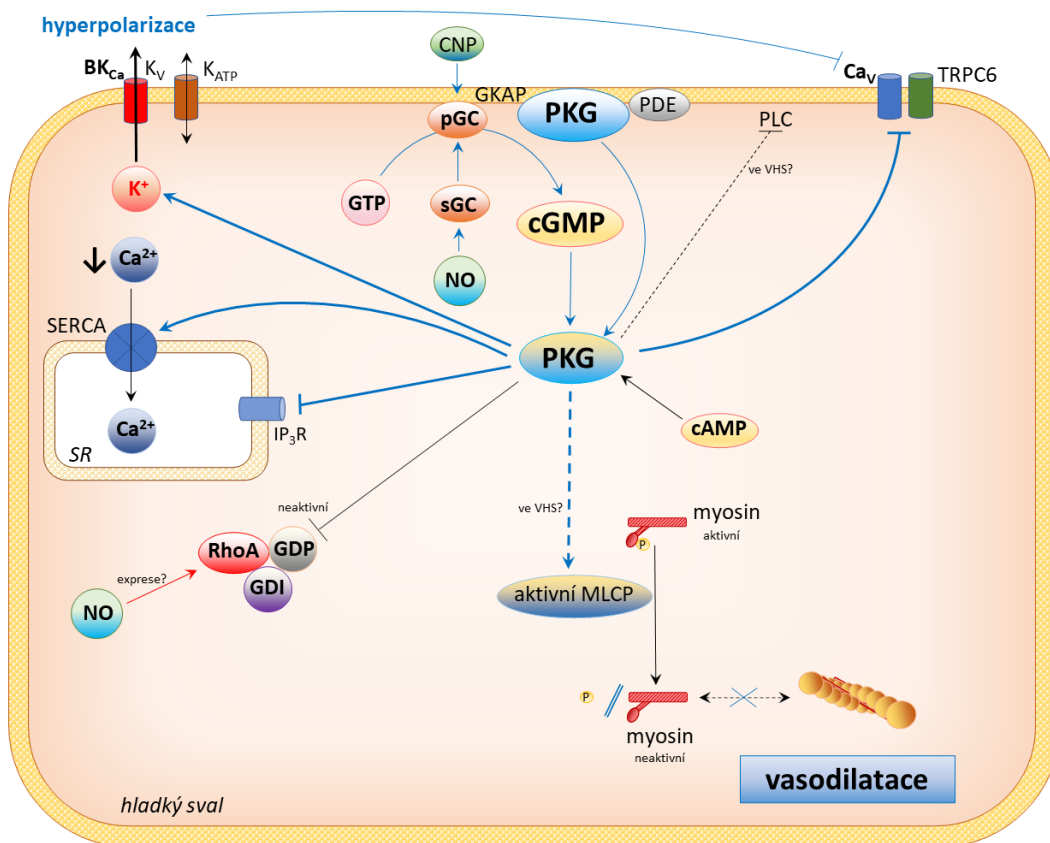
Aktivní PKG fosforyluje řadu cílů a podobně jako PKA se pojí s hyperpolarizací PM, poklesem koncentrace $[Ca^{2+}]_c$, defosforylací MLC a vasodilatací:

- aktivuje kanály BK_{Ca} a K_V na PM, dochází k efluxu K^+ . Aktivuje i kanály K_{ATP}
- inhibuje kanály $Ca_v1.2$ a TRPC6 na PM [138]
- aktivuje ATPázu SERCA na SR fosforylací fosfolambanu [36]
- fosforylací inhibuje aktivaci RhoA a tím signální dráhu RhoA/ROCK [139]
- nepřímo inhibuje IP_3R na SR přes IRAG (z angl. *inositol trisphosphate receptor-associated cGMP-kinase substrate*) [140, 141]
- fosforyluje GAP, tím stimuluje GTPázovou aktivitu G-proteinu a snižuje množství aktivního RhoA-GTP [142]
- inhibuje PLC_β a tím snižuje produkci DAG a IP_3 . Tento účinek byl prokázán zatím jen na hladkém svalu GIT [44], důkaz pro VHS chybí
- snad aktivuje fosfatázu MLCP fosforylací MYPT 1 [143]. Tento účinek byl prokázán v žaludečním hladkém svalu, kde PKG fosforyluje protein M-RIP spojený s MYPT1. Je možné, že podobný mechanismus funguje i ve VHS [144]

Dualita účinku PKG

O provasokonstrikčním působení PKG víme zatím málo. Bazální produkce NO a dráha NO/sGC/PKG je pravděpodobně nutná pro expresi RhoA, a proto i pro dráhu RhoA/ROCK [145].

Roli PKG shrnuje obrázek 7.



Obr.7 Role proteinkinázy G ve vasodilataci. Modře jsou znázorněny hlavní děje spojené s vasodilatací, červeně možný vliv NO na expresi RhoA. Je znázorněna také stabilizace RhoA a předpokládaná inhibice fosfolipázy C. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

3. Endotel ve vasodilataci a vasokonstrikci

VHS je silně ovlivněn sousedním endotelem. Monovrstva endoteliálních buněk zprostředkovává komunikaci mezi krví a buňkami VHS. Signály mohou být chemické i mechanické (smykové tření při toku krve, natažení cévní stěny, teplota). Jejich účinek obvykle zprostředkovávají lumenální endoteliální receptory. Na VHS působí i látky vzniklé přímo v endotelu. Mohou účinkovat vasodilatačně (NO, prostacyclin, H₂O₂) i vasokonstrikčně (endothelin 1, PGF_{2α}, TxA₂, 20-HETE). Dalším důležitým způsobem působení je změna membránového potenciálu endoteliální buňky. Šíří se pomocí *gap junctions*, které usnadňují komunikaci jak mezi endotelem a VHS, tak mezi sousedními endoteliálními buňkami. Myoendoteliální *gap junctions* (MEGJ) hrají roli zejména v rezistentních arteriích. Množství MEGJ i komunikace mezi VHS a endotelem klesají s věkem. Při výsledné reakci je zajímavá role Ca²⁺. Zatímco v buňkách VHS nárůst koncentrace [Ca²⁺]_c působí provasokonstrikčně, naopak při nárůstu v buňkách endotelu dochází k relaxaci VHS.

3.1. Vasodilatace závislá na endotelu

Hlavní význam mají produkce relaxujících faktorů EDRF (z angl. *endothelium-derived relaxing factors*) a navození hyperpolarizace plazmatické membrány EDH (z angl. *endothelium-dependent hyperpolarization*) [146-148]. Mezi EDRF patří zejména NO (někdy je řazen samostatně) a dále prostacyklin, H₂O₂, epoxyeikosatrienové kyseliny, CO, H₂S či acetylcholin. NO byl dlouho považován za hlavní endoteliální mediátor vasodilatace a byla mu věnována největší pozornost. Nyní se zdá, že NO je dominantním EDRF pouze ve velkých artériích, zatímco v menších odporových cévách tuto roli přebírá jiný EDRF, hlavním kandidátem je H₂O₂. Základem EDH je hyperpolarizace PM endoteliální buňky, která se přeneší na sousední VHS. Nejznámějším spouštěčem je nárůst endoteliální koncentrace [Ca²⁺]_c, který aktivuje endoteliální kanály K_{Ca} a eflux K⁺. Stejně účinkuje mírný vzestup extracelulárního K⁺ (~jednotky mM) prostřednictvím aktivace kanálů K_{ir} a Na⁺/K⁺ výměníku. Výrazný vzestup extracelulárního K⁺ (od ~10mM) naopak vyvolá kontrakci.

3.1.1. NO

NO je tvořen především konstitutivní endoteliální NO syntázou (eNOS) z *L*-argininu. Pro vznik NO jsou nutné některé kofaktory jako tetrahydrobiopterin (BH₄), flavin adenin dinukleotid, flavin mononukleotid, kalmodulin či hem [149, 150]. Např. BH₄ umožňuje dimerizaci eNOS, která je podmínkou produkce NO. Monomery naopak vytvářejí superoxidový anion O₂⁻, ale i H₂O₂ za stavu zvaném „*eNOS uncoupling*“ (rozpojení) [151]. Neaktivní eNOS je vázána na PM na kaveolin-1. K její disociaci a aktivaci dochází s nárůstem endoteliální koncentrace [Ca²⁺]_c anebo na Ca²⁺ nezávisle. Na vzniku NO se podílejí i jiné EDRF (viz kapitola 3.1.2).

Aktivace eNOS závislá na Ca²⁺

Nárůst koncentrace [Ca²⁺]_c aktivuje eNOS prostřednictvím komplexu Ca²⁺-kalmodulin. Výměnou kaveolinu-1 za Ca²⁺-kalmodulin se změní konformace eNOS a je umožněna produkce NO. Výměnu usnadňuje HSP90, který se pravděpodobně podílí na začlenění hemu do eNOS a tím na dozrání enzymu. Prostřednictvím Ca²⁺ účinkují především agonisté receptorů G_q na endoteliální PM, aktivuje se osa PLC/IP₃+DAG. Reakce je dvoufázová: IP₃ se rychle váže na receptor IP₃R na SR, zvýší se endoteliální koncentrace [Ca²⁺]_c. Důsledkem toho se aktivuje vstup externího Ca²⁺ (SOCE). Nejdůležitější a asi i nejrychlejší je systém STIM1/Orai (bude zmíněn dále) [152]. O něco pomaleji se v PM aktivují kanály TRPC a TRPV (vazba STIM1) a na této aktivaci se podílí DAG [10]. Dostatečným zvýšením koncentrace [Ca²⁺]_c se na PM endoteliální buňky aktivují kanály IK_{Ca} a SK_{Ca}. Eflux K⁺ vede k hyperpolarizaci a zvýšení koncentrace K⁺ vně

VHS [153, 154]. Tímto způsobem působí např. bradykinin (receptor B₂), substance P (receptor NK₁), histamin (receptor H₁), ADP (receptor P₂Y), acetylcholin (receptor M₃) nebo 17β-estradiol (membránový receptor GPER – z angl. *G protein-coupled estrogen receptor*) [147, 148, 155, 156].

Aktivace eNOS nezávislá na Ca²⁺

Aktivace eNOS může proběhnout nezávisle na Ca²⁺ pomocí posttranslační fosforylace (Ser1177, u některých druhů Ser1179) za účasti HSP90 [157-159]. Tímto způsobem účinkují agonisté na endoteliálních receptorech typu G_s, např. prostacyklin (IP₁ receptory), prostaglandin E₂ (EP₂ receptory), adrenalin (β₂ receptory) a histamin (H₂ receptory). Děj probíhá zejména po kaskádě cAMP/AC/aktivace PKA/fosforylace eNOS nebo cAMP/aktivace EPAC/aktivace PI₃K /aktivace PKB/fosforylace eNOS [160]. Jiná fosforylace eNOS (Thr495) vede k inaktivaci kináz PKC a AMPK [148, 161]. Je dokonce možné, že fosforylace Ser1177 a Thr495 osciluje mezi oběma místy. Fosforylace eNOS může probíhat i na dalších místech a vést jak k aktivaci (Ser635, Ser617), tak k inhibici (Ser116). Aktivitu eNOS překvapivě zvyšují také agonisté receptorů typu G_i a to zřejmě opět prostřednictvím HSP90. Zároveň ale inaktivují adenylátcyklázu a snižují množství aktivní PKA, což působí proti vasodilataci [147, 148]. Příklady takových látek jsou 5-HT (receptory 5-HT₁), α₂ agonisté nebo endothelin 1 (receptory ET_B).

Jiný princip účinku má protein kavnoxin. Vazbou na caveolin-1 brání inaktivaci eNOS a podporuje tak tvorbu NO. Farmakologická aktivace eNOS by do budoucna mohla být terapeuticky zajímavá.

Aktivace eNOS fyzikálními podněty

Enzym eNOS ovlivňují také fyzikální podněty. Při poklesu rychlosti toku krve nebo při přechodu laminárního proudění na turbulentní klesá tvorba NO [148, 162]. Naopak zvýšené smykové tření a proudění krve při akutní i dlouhodobé fyzické aktivitě aktivuje eNOS a vede k EDH [163]. Na tomto způsobu vasodilatace se podílejí AT receptory pro angiotenzin II cestou G_q/PLCγ1/IP₃+DAG. Existují informace zejména ve prospěch AT₁ [42], ale i AT₂ [164]. Dojde k aktivaci endoteliálních kanálů TRPV4 [165], IK_{Ca} [166] a SK_{Ca} [167] a také k autokrinní produkci bradykininu. Smykové tření působí i pomocí posttranslační fosforylace eNOS, zatím ne zcela jasným způsobem. Jiným fyzikálním faktorem je chlad. Mírný chlad (nad 31 °C) stimuluje TRP kanály, kandidáty jsou TRPA1, TRPV4 [168] a od ~20 °C TRPM8 [169]. Tento účinek dokáže vyrušit atropin, což naznačuje lokální produkci acetylcholinu endotelem a možný fyziologický význam M₃ receptorů. Vasodilatace za účasti acetylcholinu nabývá na významu

za patologických stavů, zejména za hypertenze [168, 170]. Pokles teploty pod 31 °C pravděpodobně zasáhne přímo hladký sval.

Uvolnění NO z jeho metabolitů

Zatím ne zcela jasnou roli mají produkty metabolismu NO jako jsou S-nitrosothioly, nitrity a nitráty. Mohly by fungovat jako zásobárny a za určitých podmínek zpětně uvolňovat NO. Např. hemoglobin působí jako kyslíkový senzor a při hypoxii generuje NO z nitritů [171], podobně účinkuje mitochondriální cytochromoxidáza c [172]. Tímto způsobem by organismus mohl zlepšovat prokrvení hypoxických tkání. Na druhou stranu hemoglobin působí také jako *scavenger* NO a reguluje tak jeho difúzi do VHS. Produkci NO nepřímo ovlivňují NOSTRIN a NOSIP (z angl. *eNOS traffic inducer* a *eNOS interacting protein*), které podporují translokaci eNOS z *caveolae* do intracelulární oblasti a produkci NO. O NOSTRINU je známo, že interaguje přímo s membránovými M₃ receptory [173].

Produkci NO naopak snižují vazokonstrikční látky a uplatní se zejména aktivace systému RhoA/ROCK.

Účinky NO

Vzniklý NO difunduje z endoteliální buňky do VHS, kde aktivuje osu NO/sGC/PKG. sGC obsahuje hemovou část, která dokáže velmi dobře vázat NO a pravděpodobně deteguje i jeho pikomolární množství. Ve VHS se sníží koncentrace [Ca²⁺]_c a dojde k rychlé inaktivaci PKC, defosforylaci CPI-17, inaktivaci MLCK, defosforylaci MLC a svalové relaxaci [143]. NO působí ve VHS i nezávisle na sGC a to prostřednictvím ATPázy SERCA na SR, kterou aktivuje S-nitrosylací [174]. Účinek NO podporuje hyperpolarizace endoteliálních buněk, která jednak zvyšuje produkci endoteliálního NO, a jednak se přenáší přes MEGJ do VHS. Kromě toho NO v endotelu snižuje uvolňování vazokonstrikčního endothelinu 1. Regulace vzniku NO má přesah i do krve. Agregující destičky uvolňují 5-HT a ADP, které zvyšují produkci NO [148]. NO naopak snižuje agregaci destiček a expresi adhesních molekul na povrchu endotelu.

3.1.2. Další EDRF

V posledních letech se ukazuje, že zejména v menších artériích má význam EDH vasodilatace zprostředkovaná dalšími EDRF. Tyto látky mohou působit jak na endotel, tak na sousední buňky VHS. Některé dokážou aktivovat eNOS, jiné účinkují nezávisle na vzniku NO. Mohou působit prostřednictvím membránových receptorů typu G_s (např. prostacyklin) nebo typu G_q (acetylcholin) i mít oba tyto účinky (epoxyeikosatrienové kyseliny). Mechanismy

jsou analogické jako ty, popsané u aktivace eNOS. Např. u agonistů receptorů typu G_q probíhá dvoufázová hyperpolarizace (úvodní rychlé uvolnění Ca^{2+} z endoteliálního SR, následuje o něco déle trávající influx extracelulárního Ca^{2+}). Nárůst koncentrace $[Ca^{2+}]_c$ otevře endoteliální K^+ kanály a konečným důsledkem je hyperpolarizace PM [175, 176]. Jiným způsobem působení je aktivace membránové pGC a vznik cGMP (natriuretický peptid C) a dalším přímé intracelulární působení ve VHS (H_2O_2 , CO, H_2S) [148, 159]. Tyto látky mohou např. aktivovat sGC (CO) nebo kanály BK_{Ca} (H_2O_2 , CO) a K_v (H_2O_2 , H_2S).

Nejznámější EDRF

H_2O_2 vzniká ze superoxidového anionu O_2^- účinkem superoxidodismutázy SOD, O_2^- vznikají mimo jiné i jako vedlejší produkty tvorby dalších EDRF, epoxyeikosatrienových kyselin. Tvorba H_2O_2 je propojena s produkcí NO: O_2^- reaguje s NO za vzniku peroxynitritu ONOO $^-$ a tím snižuje dostupný NO. Peroxynitrit je považován za silný oxidant. Oxiduje mj. kofaktor BH_4 , což způsobí monomerizaci eNOS (výše uvedený „*eNOS uncoupling*“). Monomerní eNOS vytváří O_2^- a H_2O_2 . Snižená NO vasodilatace je tak částečně kompenzována právě H_2O_2 . H_2O_2 zejména aktivuje K^+ kanály VHS (BK_{Ca} , K_v , K_{ATP}) [177] a je možné, že zprostředkovaně aktivuje i sGC [178, 179]. Význam H_2O_2 tak stoupá při poruše tvorby NO při endoteliální dysfunkci. H_2O_2 jsou schopny vytvářet i buňky VHS. Je možné, že právě H_2O_2 je klíčovým mediátorem EDH v mikrocirkulaci, což by osvětlovalo, proč chronická antioxidační terapie nezlepšuje mortalitu pacientů [180].

Deriváty kyseliny arachidonové: Hlavní význam při vasodilataci mají prostacyklin a epoxyeikosatrienové kyseliny. Jejich syntéze předchází uvolnění kyseliny arachidonové z PM pomocí fosfolipázy A_2 (PLA_2). Mezi různými isoformami hraje v cévách hlavní roli c PLA_2 (cytosolická), která se aktivuje mikromolárními koncentracemi Ca^{2+} . **Prostacyklin** (PGI_2) vzniká účinkem COX. Klasicky byla jeho produkce spojována s endoteliálním COX-2, ale přibývají důkazy, že za fyziologického stavu převládá COX-1. Na VHS stimuluje svůj receptor IP_1 typu G_s a aktivuje osy AC/cAMP/PKA a AC/cAMP/EPAC. PGI_2 , stejně jako NO, inhibuje agregaci destiček [127, 147, 181]. Vasodilatační účinek PGI_2 klesá s věkem [226]. **Epoxyeikosatrienové kyseliny** (EETs) jsou produkty kyseliny arachidonové vzniklé prostřednictvím CYP2C9. Jejich tvorbu spouští agonisté na endoteliálních G_q (např. acetylcholin, bradykinin) a také smykové tření [182-184]. V mikromolárních koncentracích aktivují kanály K_{Ca} a navozují hyperpolarizaci. Jsou to agonisté receptoru GPR40. Pravděpodobně existuje i jiný receptor [185], kandidátem jsou kanály TRPV4, které tvoří komplex s BK_{Ca} [186]. Aktivace receptorů GPR40 je spojena s G_q i G_s aktivitou [187]. Průběh vasodilatace vlivem EETs není zcela jasný. Možné mechanismy jsou: 1) na endoteliálních buňkách jsou aktivovány receptory $G_q/PLC/IP_3+DAG/PKC$ a na účinku se

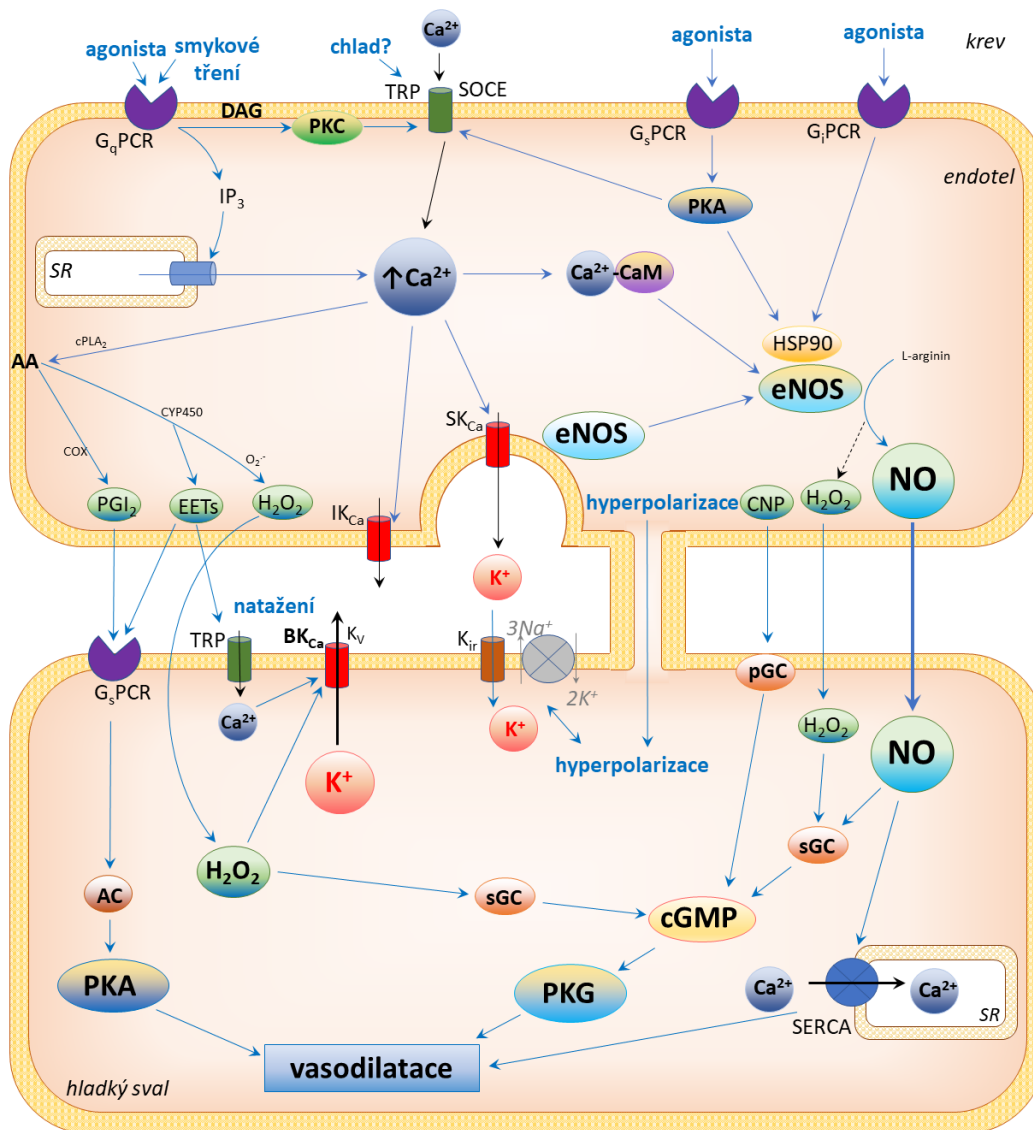
podílejí endoteliální kanály TRPC1, TRPC3 a TRPC6. Prostřednictvím kanálů IK_{Ca} a SK_{Ca} je navozena hyperpolarizace, která se přenesse na VHS díky MEGJ a aktivací Na^+/K^+ -ATPázy a kanálů K_{ir} ; nebo se 2) na VHS prostřednictvím aktivace $G_s/AC/cAMP$ aktivují kanály BK_{Ca} a zřejmě i K_v a K_{ATP} . Aktivace BK_{Ca} možná probíhá zprostředkovaně pomocí CO, který vzniká po aktivaci hemoxygenázy [188]. Oba mechanismy účinku epoxyeikosatrienových kyselin pravděpodobně existují paralelně podle typu cévy a živočišného druhu [159, 189-192]. Kromě toho je stále více zřejmé, že jednotlivé EETs účinkují odlišně. Např. 11,12-EET je generována při hypoxii a ovlivní endoteliální TRPC6 [193], zatímco působení 5,6-EET se pojí se smykovým třením a s účinkem na hladkosvalové TRPV4 [186].

Produkty lipooxygenázy (15-LOX) kyselina 15(*S*)-hydroxy-11,12-epoxyeikosatrienová (15-H-11,12-EETA) a kyselina 11(*R*),12(*S*),15(*S*)-trihydroxyeikosatrienová (11,12,15-THETA) jsou mezi EDRF zatím méně prozkoumány, nicméně u nich se poprvé podařilo prokázat, že jsou indukovatelné. Expresi 15-LOX zvyšují např. hypoxie, hypercholesterolemie, ateroskleróza, anemie, estrogény, interleukiny a snad některé další hormony [194].

Natriuretický peptid C (CNP) vzniká a je uskladněn v endotelu. Uvolňuje se např. smykovým třením. Působí vasodilatačně aktivací membránové $pGC/cGMP/PKG$ a navozením hyperpolarizace VHS [195].

Na endotel působí i další látky, které usnadňují vasodilataci, jako jsou inzulin [196], vitamin D [197] a adipokiny z tukové tkáně, zejména adiponektin [198]. Inzulin vyvolává vasodilataci klasicky prostřednictvím NO. V případě inzulinové rezistence působí naopak vasokonstrikčně a proliferačně, podrobné informace stále chybí. Na endotelu závislou vasodilataci zřejmě podporuje i řada přírodních látek, kterým je věnováno mnoho klinických studií, bohužel se značně nejednotnými metodikami. Mezi testovanými produkty vynikají flavonoidy a další polyfenoly [199, 200]. Vasodilataci závislou na endotelu dokážou akutně potencovat fytoestrogeny [201] a také SERMs, ale i zde zatím chybí informace [202-204].

Úlohu endotelu při vasodilataci shrnuje obrázek 8.



Obr.8 Úloha endotelu při vasodilataci a přenos účinku na vaskulární hladký sval. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

3.2. Vasokonstrikce závislá na endotelu

V endotelu vznikají vasokonstrikční faktory (EDCF), které difundují k sousedním buňkám VHS i ovlivňují samotný endotel. Přiměřená vasokonstrikce závislá na endotelu je součástí fyziologické autoregulace myogenního tonu. Pokud začne převažovat, mluvíme o endoteliální dysfunkci. Hlavním znakem je narušená tvorba NO a dalších EDRF. Rizikovými faktory jsou věk, obezita a nemoci (především hypertenze a DM), podíl má zvýšený oxidační stres. Nejnámějším EDCF je endothelin-1, i když dnes převažuje názor, že větší význam mají vasokonstrikční prostaglandiny. Existují i další, neprostanoidní vasokonstriktoři, nejnámějším je 20-HETE. Proti

endoteliální vasokonstrikci účinkují např. estrogeny, které snižují produkci EDCF a potlačují reakci zprostředkovanou receptory TP pro TxA₂ [205, 206].

Produkci EDCF překvapivě spouští i agonisté endoteliálních G_q receptorů, např. acetylcholin (receptory M₃) nebo ATP (purinoceptory P2Y). Primárně sice vyvolávají EDH a vasodilataci, ale mohou mít i opačný vliv. Mechanismus není zcela jasný. Je možné, že se podílí aktivace fosfolipázy A₂ (iPLA₂) nezávislé na Ca²⁺. Vzniklé lysofosfolipidy by mohly otvírat kanály TRP, následný influx Ca²⁺ by mohl aktivovat cPLA₂, uvolnění kyseliny arachidonové a vznik vasokonstrikčních PGF_{2α} a TxA₂ prostřednictvím COX [148]. Vznik jednotlivých prostanoidů určuje dostupnost příslušných enzymů (prostaglandinsyntáz) a jejich aktivita (vliv ROS). Také náhlé nebo výrazné natažení cévní stěny může spustit kontrakci [207], pravděpodobně více způsoby. Na zachycení se podílejí některé kanály TRP (dříve označované jako SAC), membránové glykoproteiny integriny a PECAM-1 (z angl. *platelet endothelial cell adhesion molecule*). Výsledkem je aktivace signálních kaskád, např. aktivace kinázy PI₃K a systému RhoA/ROCK [208]. Za některých podmínek může vasokonstrikčně působit dokonce NO. Při hypoxii dokáže navodit kontrakci koronárních artérií, která je závislá na sGC, ale nesouvisí s cGMP. Pravděpodobně vzniká cyklický inosin monofosfát (cIMP) a tento účinek je spojený s aktivací kinázy ROCK [209, 210]. Podobně acidifikace endoteliálních buněk a VHS překvapivě inhibuje aktivitu eNOS [211].

3.2.1. Endothelin 1

Endothelin 1 (ET-1) je asi nejznámějším EDCF. Je to malý peptid (21 AK), který vzniká z big-ET-1 účinkem ECEs (z angl. *endothelin converting enzymes*). Účinkuje prostřednictvím receptorů ET_A a ET_B. Na PM VHS se nacházejí oba typy, dominují ET_A, a oba se pojí s vasokonstrikcí. Na PM endotelu se nalézají ET_B, zde se ale pojí s vasodilatací. ET-1 po uvolnění z endoteliálních buněk vyvolá dvoufázovou reakci – nejprve krátkodobý pokles TK aktivací endoteliálních ET_B (G_q a G_i), která zvýší produkci NO a PGI₂. Oba mediátory difundují k VHS a tam účinkují vasodilatačně přes sGC/PKG a receptor IP₁ (G_s)/AC/cAMP. K vasodilataci přispívá hyperpolarizace, která se na VHS přenáší pomocí MEGJ. Posléze následuje vasokonstrikce daná zejména aktivací ET_A na VHS [212]. Vzniká nejméně dvěma způsoby: prostřednictvím G_q/PLC/IP₃+DAG a G_{12/13}/RhoA/ROCK. Na vasokonstrikci se částečně podílejí i hladkosvalové receptory ET_B.

Díky rychlé eliminaci je účinek ET-1 zřejmě hlavně lokální [213]. Za fyziologických podmínek je množství ET-1 přísně regulováno. Samotný ET-1 po reakci s ET_B zvyšuje vznik NO, který inhibuje ECEs [214]. Dalším regulátorem je CGRP (z angl. *calcitonin gene-related peptide*), který podporuje disociaci ET-1 z receptoru ET_A. CGRP pravděpodobně vzniká v perivaskulárních

senzorických neuronech, a je možné, že účinkuje přes membránový receptor a β γ podjednotky G-proteinu [215]. CGRP může být uvolněn i kapsaicinem prostřednictvím kanálů TRPV1 [216]. Kromě toho CGRP aktivuje K_v kanály, což přispívá k zvýšení polarity PM a vasodilataci.

Za fyziologického stavu se ET-1 účastní místní regulace krevního tlaku a farmakologická blokáda jeho receptorů má jen mírný účinek. Jeho význam se zvyšuje za hypoxie [217] a patologických podmínek. Konstitutivní produkce stoupá u diabetiků, roste hladina ET-1 v plazmě a vyvíjí se hyperreaktivita na jeho účinky, vzniká endoteliální dysfunkce [218]. U hypertoniků ET-1 zvyšuje tonus aferentních i eferentních glomerulárních arteriol a snižuje glomerulární filtraci [219], působí prozánětlivě a profibroticky a podporuje vaskulární remodelaci při současně stoupající tvorbě ROS [220]. Hladina ET-1 nemusí ale být u hypertoniků nutně zvýšená, snad díky účinné eliminaci [221]. Antagonisté ET-1 v klinické praxi zatím narážejí na nežádoucí účinky (periferní edémy, reprodukční toxicita u zvířat). Uplatní se při terapii plicní hypertenze (ambrisentan, bosentan, macitentan). ET-1 se také podílí na vývoji aterosklerózy, při infarktu myokardu a zasahuje i do srdečního selhávání. Tato úloha může být duální [222], možný farmakologický zásah není zatím vyřešený.

3.2.2. Další EDCF

Vasokonstrikční prostanoidy

Pro vasokonstrikci mají větší význam prostanoidy vzniklé v endotelu, které difundují k VHS, spíše než ty vzniklé přímo ve VHS. Zdrojem je za fyziologických okolností hlavně COX-1, ale za patologických (hypertenze, diabetes, obezita) se zvyšuje význam up-regulované COX-2 [223, 224]. Exprese COX-2 roste i s věkem, podíl na tom by mohlo mít zvýšené smykové tření při pulzatilním toku krve [225]. Vasokonstrikčně působí zřejmě více prostanoidů a jejich role se liší podle živočišného druhu a typu tkáně. Účinky byly dosud prokázány zejména pro PGH_2 a z něho odvozené $PGF_{2\alpha}$ a TxA_2 [226-228]. Produkce TxA_2 byla klasicky spojována pouze s krevními destičkami, dnes je ale jasné, že může vznikat i v endotelu (prvně popsáno u aorty hypertenzních SHR potkanů) [226]. Oba prostanoidy působí na VHS prostřednictvím receptorů G_q : FP ($PGF_{2\alpha}$) a TP (TxA_2 , PGH_2) [224, 229]. Konečný výsledek je dán nastolenou rovnováhou mezi působky, např. vasokonstrikčním TxA_2 a vasodilatačním PGI_2 . Důležitost jednotlivých působků se zřejmě liší podle živočišného druhu i typu tkáně.

Za zmínku stojí vasokonstrikční **hydroxyeikosatetraenové kyseliny**, zejména **20-HETE**. Jedná se o eikosanoid a metabolit kyseliny arachidonové (enzymy CYP4A a CYP4F). Základem jeho vasokonstrikčního působení jsou inhibice kanálů K_{Ca} a aktivace kinázy ROCK. Je propojen se

systémem renin/angiotensin, kdy angiotenzin II indukuje syntézu a uvolňování 20-HETE a naopak 20-HETE v endoteliálních buňkách zvyšuje transkripci ACE [230]. Také ruší endoteliální účinky inzulínu [231]. 20-HETE je rovněž agonistou tromboxanových receptorů TP [232], není ale vyloučeno, že má i své specifické receptory. 20-HETE je dnes považován za faktor podporující vznik hypertenze a vaskulární dysfunkce [230].

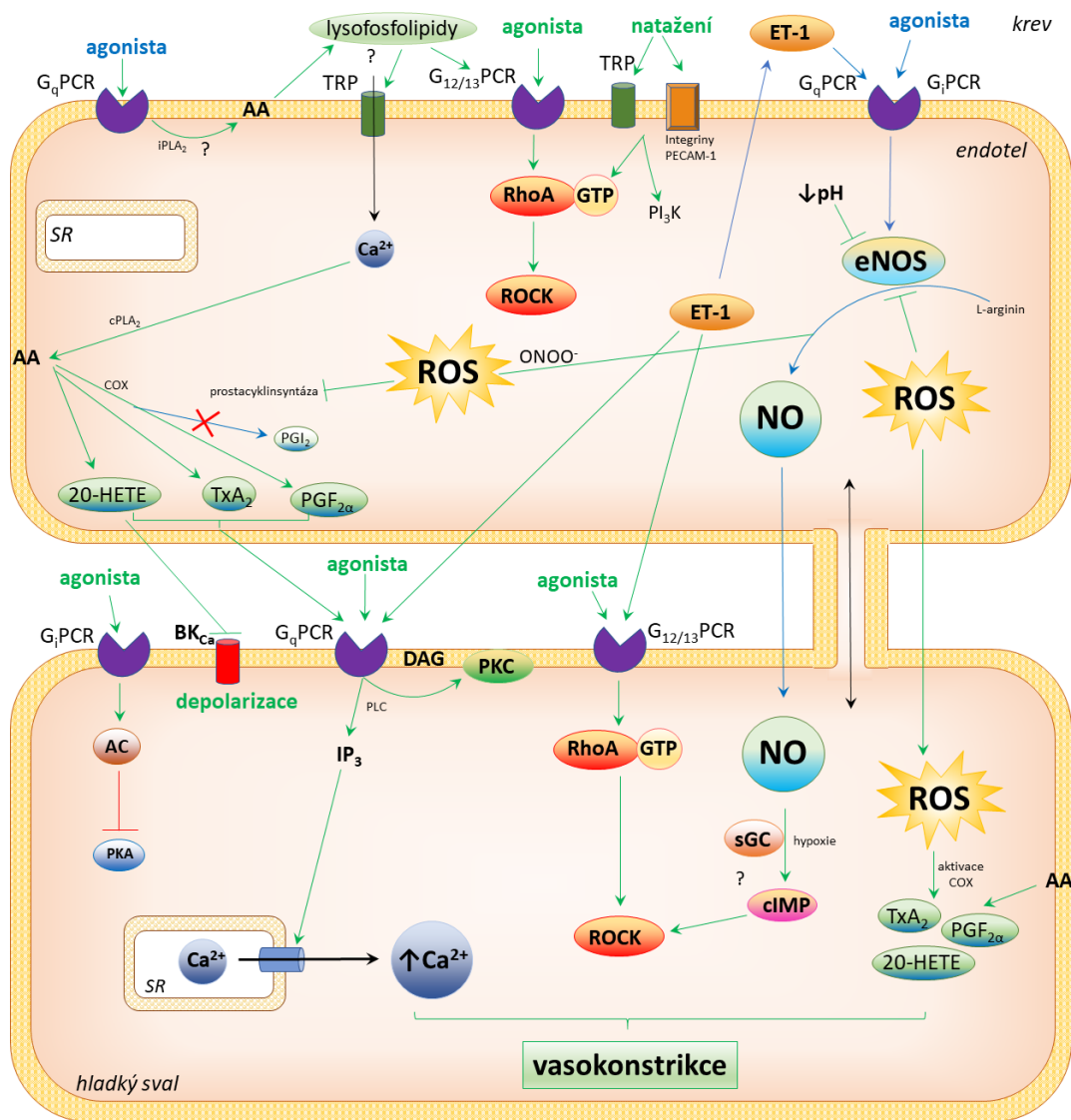
3.2.3. Faktory podporující vasokonstrikci závislou na endotelu

Nejnámějšími faktory podporujícími vasokonstrikci závislou na endotelu jsou ROS. Působí více způsoby, zejména: 1) brání dimerizaci eNOS a vzniku NO [233]; 2) superoxidové anionty reagují s přítomným NO za vzniku již zmíněného peroxynitritu, dochází k inaktivaci prostacyklinsyntázy nitrací tyrosinových zbytků a zvýšené tvorbě PGE₂ a z něho PGF_{2α} [234], 3) difundují k VHS, aktivují zde COX a produkci vasokonstrikčních prostanoidů [235]. Hlavním zdrojem endoteliálních ROS je zřejmě COX [236], ale existují i další zdroje, včetně monomerní eNOS. ROS mohou vznikat i v PVAT, kde mimo jiné narušují působení adiponektinu [237].

Vasokonstrikci vlivem EDCF potenceje obezita. Podílí se na tom inzulínová rezistence s vyšší produkcí ROS v PVAT, zvýšená produkce ET-1 a up-regulace TP receptorů [238]. Podobné účinky mají diabetes a hypertenze. Expozice endotelu vysokým hladinám glukózy vede k oxidačnímu stresu a zvýšené expresi COX-1, COX-2 i TP receptorů ve VHS. U hypertenze se přidává vyšší nárůst množství Ca²⁺ v buňkách endotelu [236]. Další provasokonstrikčním faktorem je věk, podílejí se upregulace COX a zvýšené množství ROS. Je možné, že vasokonstrikci vlivem EDCF podporuje i nedostatek vitamínu D [239, 240].

Endoteliální dysfunkce (tj. převaha EDCF) je podpořena také mnoha nepřímými faktory. Mezi ně patří například zvýšená aktivita arginázy při kardiovaskulárních onemocněních způsobující nedostatek L-argininu, nedostatek BH₄ nebo S-glutathionylace (vyvolá monomerizaci eNOS).

Úlohu endotelu při vasokonstrikci shrnuje obrázek 9.



Obr.9 Úloha endotelu při vasokonstrikci a přenos účinku na vaskulární hladký sval. Zkratky jsou vysvětleny v textu.

4. Iontové kanály a ATPázy

Pro vasokonstrikci a vasodilataci jsou zásadní membránový potenciál a koncentrace $[Ca^{2+}]_c$. Na jejich regulaci se významně podílejí iontové kanály. Zde bude uveden jejich souhrnný přehled a popsána vzájemná součinnost.

4.1. Přehled iontových kanálů

Kanály K_v vrací PM ke klidovému membránovému potenciálu. Zprostředkovávají funkční vasodilataci a chápeme je jako negativní zpětnou vazbu při regulaci myogenního tonu cév [241]. Jsou aktivované především depolarizací PM, dále vasodilatátory přes dráhu $G_s/cAMP/PKA$ (některé K_v jsou aktivovány také podjednotkami $G_{\beta\gamma}$), prostřednictvím dráhy $NO/cGMP/PKG$, některými EDRF (H_2O_2 , H_2S), pojí se s hypoxií a acidózou. Otevírat by je mohly i adipokiny z PVAT. Naopak se inaktivují při zvýšení membránového potenciálu (-25 až -45 mV), aktivací receptorů $G_q/IP_3+DAG/PKC$ (např. angiotenzin II, α_1 agonisté) a při zvyšování koncentrace $[Ca^{2+}]_c$. Jejich uzavření podpoří depolarizaci a vasokonstrikci; inaktivují se ale také dlouhodobou depolarizací. Ve VHS je pokles jejich funkce/exprese spojený s hypertenzí [242]. V endotelu byl prokázán pokles jejich aktivity v aortě SHR potkanů [243]. Experimentálně se jako blokátor kanálů K_v používá 4-aminopyridin v koncentraci ~ 1 mM.

Kanály BK_{Ca} ($K_{Ca1.1}$) jsou ve VHS široce zastoupené. Při otevření probíhá eflux K^+ , který vede k zvýšení membránového potenciálu PM. Aktivují se nárůstem koncentrace $[Ca^{2+}]_c$, chápeme je jako hlavní kanály v protireakci na depolarizaci a vasokonstrikci. Experimentálně se k jejich zablokování používá např. iberitoxin ve velmi nízkých koncentracích ($< \sim 10$ nM) [241]. Na endotelu obdobně působí kanály **SK_{Ca} ($K_{Ca2.3}$)** a **IK_{Ca} ($K_{Ca3.1}$)**.

Kanály K_{ir} ($K_{ir2.x}$) na VHS jsou početné zejména v nejmenších arteriích. Za klidového stavu a při negativním membránovém potenciálu oproti rovnovážnému potenciálu (tj. za hyperpolarizace) vedou K^+ do buňky, při pozitivním (tj. za depolarizace) dochází k nepatrnému efluxu K^+ . Aktivní K_{ir} tedy posouvají polaritu negativním směrem a přispívají k vasodilataci. Jejich funkce není zcela jasná, předpokládají se dvě základní možnosti: 1) přispívají ke klidovému membránovému potenciálu a klidovému tonu drobných arterií, jejich zablokování navodí vasokonstrikci; 2) aktivují se při vzestupu extracelulárního K^+ (\sim jednotky mM). Amplifikují tak fyziologický nárůst extracelulárního K^+ navozený jinými K^+ kanály do hyperpolarizace VHS a vasodilatace [241]. Spouštěcí nárůst extracelulárního K^+ pochází zejména z efluxu K^+ endoteliálními kanály SK_{Ca} a IK_{Ca} [244]. Protože je zároveň aktivní Na^+/K^+ ATPáza, kanály K_{ir} jsou někdy chápány jako zesilovače jejího účinku. Také je aktivují hypoxie

a vazba agonisty na receptory G_s /cAMP/PAK. Kanály K_{ir} jsou naopak uzavírány vasokonstrikčními agonisty přes G_q /IP₃+DAG/PKC a jejich inaktivace přispívá k depolarizaci. V endotelu k jejich aktivitě přispívá smykové tření dané tokem krve, které zde má významnější roli, než u jiných kanálů [245]. Role kanálů K_{ir} se zřejmě mění s patologickým stavem. Např. u hypertenzních zvířat se neuplatňují při EDH [246]. Experimentálně se k jejich inhibici používá Ba^{2+} v koncentracích $<50 \mu M$.

Kanály K_{ATP} jsou tvořeny ze čtyř kanálů $K_{ir6.x}$ a čtyř jednotek SUR (z angl. *sulphonylurea receptor*), které patří mezi ABC proteiny (z angl. *ATP binding cassette*). Jejich aktivace se pojí s klidovým nebo zvýšeným membránovým potenciálem a vasodilatací, naopak zablokování s vasokonstrikcí. Jsou aktivní např. při hypoxii, acidóze nebo endotoxickém šoku [241]. Jejich aktivita je snížena při hypertenzi [247]. Kanály K_{ATP} inhibuje zvýšené množství ATP, jsou proto někdy označovány jako metabolický senzor. Experimentálně se k jejich inhibici používá glibenklamid (20–200 nM), k aktivaci pak kromakalim (~80 nM).

Kanály Ca_v již byly popsány výše (viz kapitola 2.1). Za klidového membránového potenciálu a hyperpolarizace jsou uzavřeny, otevírají se depolarizací. V cévách mají význam dva základní typy: $Ca_v3.x$ (typ T) a $Ca_v1.2$ (typ L), který je považován za hlavní cestu vstupu extracelulárního Ca^{2+} do buňky pro spuštění svalové kontrakce. Kanály Ca_v jsou částečně (asi 1000x méně) propustné i pro Na^+ . V experimentech se k jejich aktivaci používá BayK 8644.

Ne zcela jasné postavení mají **kanály TRP**. Většina umožňuje influx Ca^{2+} a podílejí se na vasokonstrikci. Na VHS jsou součástí SOCE (TRPC1, TRPC4, TRPC5, TRPC6 a TRPC7) a účastní se také vasokonstrikce při náhlém nebo výrazném natažení cévní stěny (TRPC6, TRPV2, TRPV4, TRPP) [248]. Dále jsou aktivovány vazbou vasokonstrikčního agonisty na receptory G_q prostřednictvím DAG, např. kanál TRPC3 je takto aktivován ET-1 a angiotenzinem II, kanál TRPC6 α_1 agonisty [249, 250]. Kanály TRP na VHS se mohou ale podílet i na vasodilataci. Kanály TRPV4 [251] a TRPC1 [252] se nacházejí v blízkosti kanálů BK_{Ca} a vstupem Ca^{2+} je aktivují, výsledkem je proto eflux K^+ a zvýšení membránového potenciálu. Obdobně se na vasodilataci na VHS podílejí i kanály TRPA1. Vasodilatace se účastní také TRP kanály v endotelu (TRPC3, TRPC4, TRPV1, TRPV3 a TRPV4) [10]. Nejvíce informací je zatím o kanálech TRPV4. Jsou aktivovány po kaskádě agonista G_q /DAG/PKC/AKAP/TRPV4 a vyvolají aktivaci endoteliálních kanálů SK_{Ca} a IK_{Ca} a EDH [123]. Jsou také kandidátem na senzor smykového tření [159]. Při hypertenzi navozené vysokým příjmem soli byla nalezena jejich up-regulace [253], zde by se mohlo jednat o kompenzační mechanismus. Endoteliální kanály TRPC6 a TRPC7 jsou podobně jako ve VHS součástí SOCE.

Kanály Cl_{Ca} jsou chloridové kanály aktivované vápníkem. Kanál by mohl tvořit protein ANO1 (syn. TMEM16). Ve VHS jeho otevření vede k efluxu Cl^- z buňky a k depolarizaci [254]. Je možné, že to samé platí i pro endoteliální buňky a navozená depolarizace by se pomocí MEGJ šířila na VHS, ale důkaz chybí. K up-regulaci kanálů Cl_{Ca} dochází při hypertenzi, mohlo by se jednat o kompenzační mechanismus.

4.2. Součinnost iontových kanálů a ATPáz

Za klidového membránového potenciálu VHS (-55 až -40 mV) probíhá bazální tok iontů. Napěťově řízené kanály K_V a Ca_V mají nízkou pravděpodobnost otevření a propouštějí velmi malé množství iontů. Pro hyperpolarizaci je zásadní aktivita K^+ kanálů na PM s efluxem K^+ a/nebo uzavření Ca^{2+} a Na^+ kanálů (Na^+ kanály jsou napěťově řízené). Pro vasodilataci je klíčový pokles koncentrace $[Ca^{2+}]_c$. Depolarizace buněk VHS má opačný průběh – uzavírají se K^+ kanály a ustává eflux K^+ a/nebo se otevírají Na^+ a Ca^{2+} kanály a probíhá influx těchto iontů. Výsledkem je snížení rozdílu membránových potenciálů, nárůst koncentrace $[Ca^{2+}]_c$ a spuštění vasokonstrikce. Na nárůst koncentrace $[Ca^{2+}]_c$ reagují otevřením Ca^{2+} řízené kanály BK_{Ca} , což vede k efluxu K^+ a opětovnému zvýšení rozdílu membránových potenciálů.

V endotelu se podobně uplatní kanály SK_{Ca} a IK_{Ca} . Aktivace obou vede k EDH, ale jejich úloha není stejná. Kanály SK_{Ca} se nacházejí v *caveolae* poblíž MEGJ, při hypertenzi jejich aktivita/exprese klesají [255, 256]. Kanály IK_{Ca} se nalézají dále od MEGJ a mimo oblasti bohaté na kaveolin-1, jejich aktivita/exprese při hypertenzi naopak stoupají [257, 258]. Zdá se, že aktivace kanálů SK_{Ca} je důležitá zejména pro vasodilataci závislou na NO, zatímco kanály IK_{Ca} se podílí hlavně na vasodilataci na NO nezávislé [259]. Nabízela se interpretace, že pokles aktivity kanálů SK_{Ca} vede k narušení generace EDH a následně k hypertenzi. Později se ale ukázalo, že funkční kanály IK_{Ca} dokážou tento efekt dostatečně kompenzovat [260]. Důležitým prvkem autoregulace průtoku krve jsou kanály K_{ir} a K_{ATP} pro svou citlivost na smykové tření a napětí cévní stěny. Podílejí se na klidovém membránovém potenciálu a na hyperpolarizaci PM.

Koncentraci $[Ca^{2+}]_c$ a membránový potenciál VHS dále regulují Na^+/K^+ -ATPáza, ATPáza PMCA a výměníky NCX a Na^+/H^+ na PM. Přesun nitrobuněčných zásob Ca^{2+} ze SR do cytoplazmy zajišťují Ca^{2+} kanály spojené s receptory RyR a IP_3R , opačně působí ATPáza SERCA. Ke vstupu extracelulárního Ca^{2+} přispívají SOC kanály na PM, které jsou řízeny zásobou Ca^{2+} v SR. Hlavní roli má systém STIM1/Orai1. Protein STIM1 v SR funguje jako senzor Ca^{2+} . Při poklesu zásob dochází k oligomerizaci STIM1 a translokaci k PM, kde dojde k interakci s proteinem Orai. Existují tři typy,

hlavní význam má Orai1. Čtyři podjednotky Orai1 vytvoří aktivní Ca^{2+} kanál pro vstup Ca^{2+} z extracelulárního prostoru. Podobně účinkuje protein STIM2, který reguluje bazální hladinu Ca^{2+} v cytoplazmě a v SR. Jeho činnost je řízena jak zásobami Ca^{2+} , tak také interakcí s kalmodulinem [152]. Komunikace mezi SR a PM by mohla probíhat i pomocí *nanojunctions* [18, 19].

4.3. Vápníkové jiskry a vápníkové vlny

Důležitou součástí fyziologie VHS jsou vápníkové jiskry a vápníkové vlny [261], které jsou výrazně propojeny s iontovými kanály. Cévy dokážou měnit průsvit podle smykového tření a tlaku krve, tlak ~ 60 mmHg vede k myogenní kontrakci [262]. Myogenní tonus je zachycen „*stretch-sensitive*“ membránovými receptory AT_1 ($\text{AT}_2?$) a prostřednictvím dráhy $\text{G}_q/\text{PLC}/\text{IP}_3+\text{DAG}/\text{PKC}$ dojde k snížení rozdílu membránových potenciálů [42]. V některých tkáních dochází k depolarizaci otevřením Cl^- kanálů. Aktivují se kanály Ca_v a ve VHS se lokálně zvýší hladina Ca^{2+} (kanály $\text{Ca}_v1.2$. $\sim 75\%$ influxu a kanály $\text{Ca}_v3.2$ $\sim 25\%$). Aktivují se kanály RyR a IP_3R na SR, což umožní přechod určitého množství Ca^{2+} do cytoplazmy (vápníkovou jiskru). Vznik vápníkové jiskry stimuluje i angiotenzin II přes receptor AT_1 [263]. Kanály RyR a IP_3R se nacházejí v blízkosti kanálů BK_{Ca} , které se takto aktivují. V důsledku této aktivace následují eflux K^+ a hyperpolarizace. Ta má za následek inaktivaci zejména kanálů $\text{Ca}_v1.2$ na PM. Uvolněný Ca^{2+} je vychytáván zpět do SR pomocí ATPázy SERCA. Konečným důsledkem vápníkových jisker je pokles koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a vasodilatace.

Jiskra zvýší lokální koncentraci Ca^{2+} na 50-100 μM , ale celková koncentrace $[\text{Ca}^{2+}]_c$ se změní jen nepatrně. Pro lokální působení jiskry je nezbytná kolokalizace všech účastníků. Kanály RyR, Ca_v a BK_{Ca} tvoří funkční jednotku a nejpravděpodobnějším umístěním jsou membránové *caveolae* [264]. Vápníková jiskra může vyvolat další jiskru (tzv. „*spark-induced spark activation*“). Pak hovoříme o vápníkové vlně, která se šíří buňkou [265]. Je zřejmě rozdíl mezi velkými a malými arteriemi. Ve velkých arteriích vápníkové vlny závisejí na aktivaci kanálů RyR a IP_3R , v malých arteriích se pravděpodobně účastní jen aktivace IP_3R [266]. Exprese kanálů RyR klesá s věkem [267].

5. Vasoaktivní látky

Vasoaktivní látky působí na VHS přímo i prostřednictvím endotelu, vazbou na membránové receptory i intracelulárně. Výsledný vliv je dán nejen typem, ale i umístěním receptoru. S vasodilatací se pojí endoteliální receptory G_q , G_s a G_i a hladkosvalové G_s . S vasokonstrikcí endoteliální receptory $G_{12/13}$ a hladkosvalové G_q , G_i a $G_{12/13}$. Jedna látka může účinkovat více způsoby. Např. 5-HT má v cévním systému receptory 5-HT₁, 5-HT₂ a 5-HT₇. Ve velmi nízkých koncentracích a za fyziologických podmínek podporuje vasodilataci přes endoteliální receptory 5-HT₂(G_q), může se podílet i aktivace receptorů 5-HT₇ (G_s). Ve vyšších dávkách (*ex vivo* > ~1 nM) a za patologických stavů naopak účinkuje vasokonstrikčně přímým účinkem na VHS prostřednictvím receptorů 5-HT₂ (G_q). V CNS se obdobně připojují i receptory 5-HT₁ (G_i) [268]. Jako agonisté receptorů 5-HT₁ vasokonstrikčně účinkují triptany. Podobně angiotenzin II ve VHS aktivuje vasokonstrikční kaskády $G_q/PLC/IP_3+DAG/PKC$ a $G_{12/13}/RhoA/ROCK$. V endotelu angiotenzin II prostřednictvím $G_{12/13}/RhoA/ROCK$ indukuje syntézu a uvolňování vasokonstrikčního 20-HETE. Na druhou stranu endoteliální receptory AT (G_q) zachycují smykové tření a stojí za aktivací vasodilatační eNOS a angiotenzin II dokáže spustit vápníkové jiskry.

Následující tabulky 1-3 uvádějí přehled hlavních mechanismů účinku vasoaktivních látek s příklady. Ne všechny vasoaktivní látky mají terapeutický potenciál, ale jsou důležité pro výzkum včetně práce *ex vivo* s izolovanou cévou.

Tab.1 Příklady vasoaktivních látek účinkujících na plazmatické membráně buněk cévního hladkého svalu

Účinek	Mechanismus	Agonista	Antagonista	Receptor	Poznámka	
vasodilatace	G _s	agonisté β ₂		β ₂		
		EETs		GPR40		
		histamin		H ₂		
		PGI ₂		IP ₁		
		PGE ₂		EP ₂		
		vasopresin		V ₂		
		5-HT		5-HT ₇		
	vznik cGMP	CNP, ANP		pGC		
	hyperpolarizace	levkromakalim		kanál K _{ir} 6.x		
		K ⁺		kanál K _{ir} 2.x Na ⁺ /K ⁺ ATPáza		
G _q			antagonisté α ₁	α ₁		
			darifenacin	M ₃		
			sartany	AT ₁		také G _{12/13} také G _i ?
blok kanálu		dihydropyridiny	kanál Ca _v 1.2			
vasokonstrikce	G _q	acetylcholin		M ₃		
		ADP		P _{2Y}	také G _i ?	
		α ₁ agonisté		α ₁		
		angiotenzin II		AT ₁	také G _{12/13} také G _i ?	
		ET-1			ET _A	také G _{12/13}
					ET _B	také G _i
		PGF _{2α}		FP	někde také G _{12/13}	
		TxA ₂		TP		
		U46619 (analog PGH ₂)				
		urotenzin II		UT		
		vasopresin		V _{1a}		
		5-HT		5-HT ₂		
	bradykinin		B ₂	také G _i malé arterioly		
	G _i	α ₂ agonisté		α ₂		
5-HT			5-HT ₁	v CNS		

Tab.2 Příklady vasoaktivních látek účinkujících na membráně buněk cévního endotelu

Účinek	Mechanismus	Agonista	antagonista	Receptor	Poznámka	
vasodilatace	aktivace eNOS závislá na Ca ²⁺	G _q	acetylcholin		M ₃	
			bradykinin		B ₂	také G _i velké elast.cěvy
			EETs		GPR40	také G _s ?
			17-β-estradiol		GPER	
			ET-1		ET _B	také G _i
			histamin		H ₁	
			substance P		NK ₁	
			5-HT		5-HT ₂	
		smykové tření		AT ₁	fyzikální podnět	
	aktivace eNOS nezávislá na Ca ²⁺	G _s	β ₂ agonista		β ₂	
			histamin		H ₂	
			5-HT		5-HT ₇	
			vasopresin		V ₂	
			PGE ₂		EP ₂	
			PGI ₂		IP ₁	
G _i		α ₂ agonista		α ₂		
	5-HT		5-HT ₁	v CNS		
vasokonstrikce	G _{12/13}	angiotenzin II		AT ₁	vliv na G _q ?	
		lysofosfolipidy		EDG		
	G _q		darifenacin	M ₃		

Tab.3 Přehled vasoaktivních látek účinkujících intracelulárně

Účinek	Mechanismus	Agonista	Antagonista	Poznámka
vasodilatace	↑cAMP, aktivace PKA	forskolin		aktivace AC
	↑cGMP, aktivace PKG	NPS (NO)		aktivace sGC
		riociguat		
		cinaciguat		
	inhibice kinázy ROCK		fasudil	
			ripasudil	
			Y27632	
inhibice výdeje Ca ²⁺ ze SR		dantrolen	inh. receptorů RyR	
inhibice PKC		kalfostin C		
↓ rozkladu cAMP a cGMP		inhibitory PDE		
vasokonstrikce	uvolnění Ca ²⁺ ze SR	↑↑↑ kofein		akt. receptorů RyR
	blok vychytání Ca ²⁺ do SR		thapsigargin	inh. ATPázy SERCA
	↓cGMP		ODQ	inhibice sGC
	aktivace PKC		bryostatin 1	při delším působení down regulace PKC

6. Seznam předkládaných publikací a podíl na jejich vzniku

1. Najmanová I, **Pourová J**, Vopršalová M, Pilařová V, Semecký V, Nováková L, Mladěnka P. *The flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat. Mol Nutr Food Res* 2016; 60(5): 981-91
Účast na provedení *ex vivo* a *in vivo* experimentů, zpracování výsledků a statistickém vyhodnocení.
2. **Pourová J**, Najmanová I, Vopršalová M, Migkos T, Pilařová V, Applová L, Nováková L, Mladěnka P. *Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo. Vascul Pharmacol.* 2018; 111:36-43
Účast na provedení *ex vivo* a *in vivo* experimentů, zpracování výsledků, statistickém vyhodnocení a sepsání publikace.
3. Najmanová I, **Pourová J**, Mladěnka P. *Mixture of phenolic metabolites of quercetin can decrease elevated blood pressure of spontaneously hypertensive rats even in low doses. Nutrients.* 2020; 12, 213
Účast na provedení *in vivo* experimentů a sepsání publikace.
4. Migkos T, **Pourová J**, Vopršalová M, Auger C, Schini-Kerth V, Mladěnka P. *Biochanin A, the most potent of 16 isoflavones, induces relaxation of coronary artery through the calcium channel and cGMP-dependent pathway. Planta Medica. Planta Med* 2020 Jul;86(10):708-716
Účast na provedení *ex vivo* experimentů, zpracování výsledků, statistickém vyhodnocení a sepsání publikace.
5. **Pourová J**, Applová L, Macáková K, Vopršalová M, Migkos T, Bentanachs R, Biedermann D, Petrásková L, Tvrký V, Hrubša M, Karličková J, Křen V, Valentová K, Mladěnka P. *The effect of silymarin flavonolignans and their sulfated conjugates on platelet aggregation and blood vessels ex vivo. Nutrients.* 2019; 11, 2286
Účast na provedení *ex vivo* experimentů, zpracování výsledků, statistickém vyhodnocení a sepsání publikace.
6. Porcu EP, Cossu M, Rassu G, Giunchedi P, Cerrib G, **Pourová J**, Najmanová I, Migkos T, Pilařová V, Nováková L, Mladěnka P, Gavini E. *Aqueous injection of quercetin: An approach for confirmation of its direct in vivo cardiovascular effects. Int J Pharm* 2018; Feb 21;541(1-2):224-233
Účast na provedení *in vivo* experimentů, zpracování výsledků, statistickém vyhodnocení a sepsání publikace.

Publikace jsou součástí habilitační práce jako přílohy.

7. Souhrn výsledků a komentáře k předkládaným publikacím

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou celosvětově hlavní příčinou úmrtí a odhaduje se, že toto číslo dále poroste z 16,7 milionů v roce 2010 na 23,3 milionů v roce 2030 [269]. Z toho vyplývá potřeba účinné léčby a prevence. Prevence je založena na ovlivnění rizikových faktorů, mezi které patří i vysoký arteriální krevní tlak. Již delší dobu se hovoří o příjmu **polyfenolických látek** potravou a snížení rizika některých chronických onemocnění včetně některých KVO a jejich rizikových faktorů, např. hypertenze a diabetes II. typu [270]. Za jejich hlavní zdroj v potravě jsou považovány ovoce a zelenina, také čaj, káva a červené víno. U polyfenolických látek epidemiologické studie naznačují příznivé biologické účinky např. antioxidační, protizánětlivé, antimikrobiální nebo antiproliferativní a zkoumají se i účinky na zdraví ve stáří [271]. Jedná se o rozmanitou skupinu dále rozdělenou na flavonoidy, fenolické kyseliny, lignany a stilbeny. Hlavními polyfenoly v dietě jsou flavonoidy, které jsou zároveň nejčastěji spojovány s příznivými účinky na KVO [272]. Při příjmu 200 mg/den mohou snížit riziko celkové mortality až o 18 %. Stejná studie prokázala jejich příznivý vliv i v případě KVO, i když na hraně významnosti [273]. Poznatky o účinku polyfenolů přinášejí rovněž práce základního výzkumu [274].

Flavonoidy jsou obvykle v potravě přijímány ve formě glykosidů a aglykon je uvolňován buď v lumen nebo v epitelu tenkého střeva. Již v epitelu probíhá metabolismus, který pokračuje v játrech. Metabolismus II. fáze jasně převládá. V každém případě je biodostupnost flavonoidů malá. Vstřebané flavonoidy jsou vylučovány zejména močí, ale část také žlučí, přičemž některé konjugáty mohou podstupovat enterohepatální oběh. Plazmatické hladiny aglykonů jsou zanedbatelné, vyšších hladin dosahují konjugáty, nejčastěji glukuronidy a sulfáty. Informace o průniku do tkání nejsou téměř k dispozici. Absorpce z GIT je celkově nízká, většina podané dávky dosáhne tlustého střeva, kde je metabolizována mikroflórou [275]. Mezi **kolonickými metabolity** flavonoidů obecně převažují malé fenolické kyseliny, jsou ale rozdíly mezi podskupinami. U flavonolů (např. kvercetin) převažují deriváty kyseliny hydroxyfenyloctové, u flavonů (např. luteolin) deriváty kyseliny hydroxyfenylpropionové, u isoflavonů (např. daidzein) to jsou ekvol a *O*-desmetylangolensin atp. [276]. Možné vstřebávání metabolitů a jejich další osud či účinky jsou předmětem intenzivního zkoumání. Vzniklé produkty se podle současných informací také v podstatné míře absorbují a dostávají se tak do centrálního kompartmentu ve volné formě nebo jako konjugáty ve vyšších koncentracích, nežli parentní látky. Protože k metabolizaci a absorpci dochází postupně během průchodu tlustým střevem, plazmatický profil může připomínat prolongovanou infuzi [275]. Interindividuální variabilita ADME je velmi vysoká. Podílí se na ní věk, pohlaví, etnikum, genotyp, složení potravy, případná léčiva a pochopitelně i střevní mikrobiom [277]. Například metabolit ekvol nacházíme výrazně

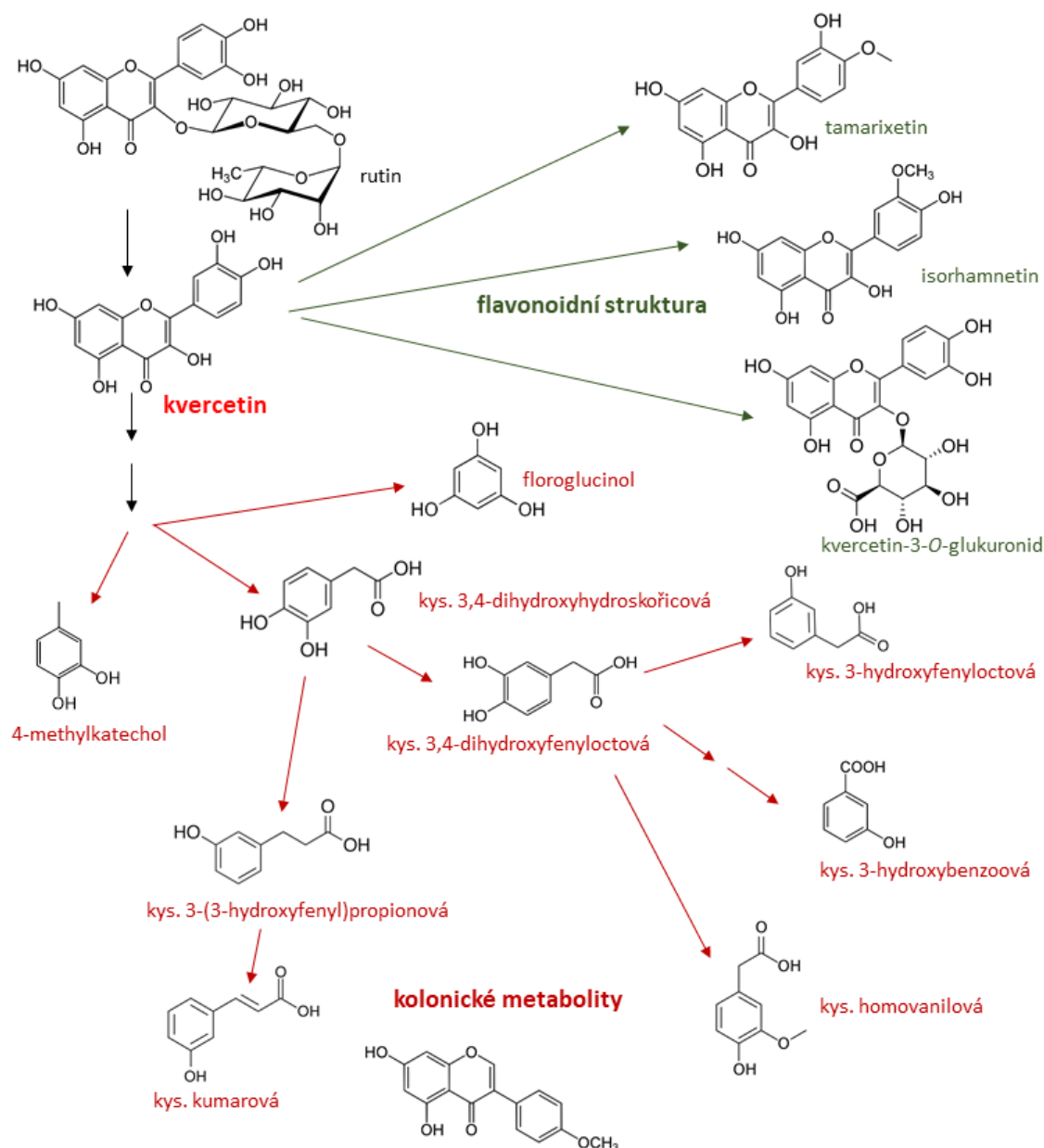
více u Asiátů než u bělochů [278]. Ekvol je zároveň příkladem metabolitu, který je účinnější, než jeho parentní látka daidzein [279]. To vše vede k domněnce, že za příznivé klinické účinky obvykle přisuzované flavonoidům mohou zodpovídat spíše jejich metabolity.

7.1. Vasodilatační účinky metabolitů kvercetinu

Práce:

- Najmanová I, Pourová J, Vopršalová M, Pilařová V, Semecký V, Nováková L, Mladěnka P. The flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60(5): 981-91
- Pourová J, Najmanová I, Vopršalová M, Migkos T, Pilařová V, Applová L, Nováková L, Mladěnka P. Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo. *Vascul Pharmacol*. 2018; 111:36-43
- Najmanová I, Pourová J, Mladěnka P. Mixture of phenolic metabolites of quercetin can decrease elevated blood pressure of spontaneously hypertensive rats even in low doses. *Nutrients*. 2020; 12, 213

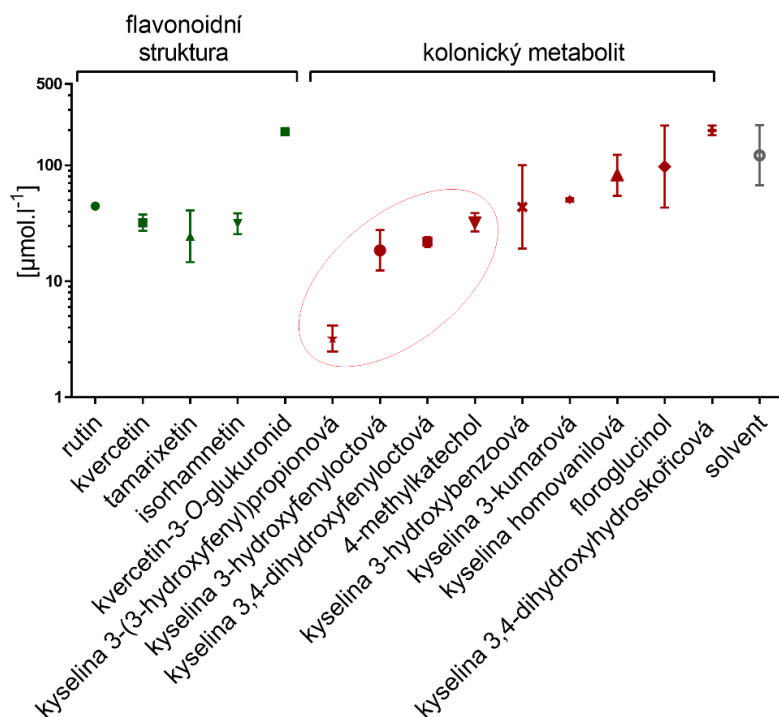
V roce 2012 se objevila zajímavá experimentální práce, která srovnávala protektivní účinky podání flavonolu kvercetinu *i.p.* a *per os* na kardiovaskulární systém u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) [280]. Překvapivě bylo zjištěno, že podání *per os* navozuje významně vyšší antihypertenzní účinek a že pouze toto podání zlepšuje endoteliální dysfunkci a oxidační stres. To vše i přesto, že naměřené hladiny metabolitů se zachovanou flavonoidní strukturou byly po *per os* podání dokonce lehce nižší. Tyto výsledky nás přivedly k myšlence, že za protektivní účinek nezodpovídá ani tak podaný kvercetin, ale jeho metabolity bez flavonoidní struktury. Vzhledem k tomu, co je známo o farmakokinetice flavonoidů, se nabízely kolonické metabolity, ale pro porovnání byly otestovány i metabolity se zachovaným flavonoidním skeletem. Začali jsme proto rozsáhlý screening vasoaktivních účinků kvercetinu, jeho glykosidu rutinu, *O*-metylovaných derivátů tamarixetinu a isorhamnetinu, konjugátu kvercetin-3-*O*-glukuronidu a malých fenolických metabolitů kverceterinu (obrázek 10).



Obr.10 Metabolismus kvercetinu a hlavní metabolity zahrnuté v screeningu vasodilatačního účinku

Screening vasodilatačního účinku kvercetinu a jeho metabolitů

Screening probíhal *ex vivo* na izolované aortě potkana po prekontrakci tkáně noradrenalinem (10 μ M). Ukázalo se, že tři malé fenolické metabolity (kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, 3-hydroxyfenylaceticá a 3,4-dihydroxyfenylaceticá) mají vyšší vasodilatační účinky než kvercetin, a jedna látka (4-methylcatechol) má s ním srovnatelné účinky. Nejúčinnější 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina byla zhruba o řád účinnější než parentní kvercetin. Naopak konjugát kvercetin-3-O-glukuronid byl zcela neúčinný (obrázek 11).



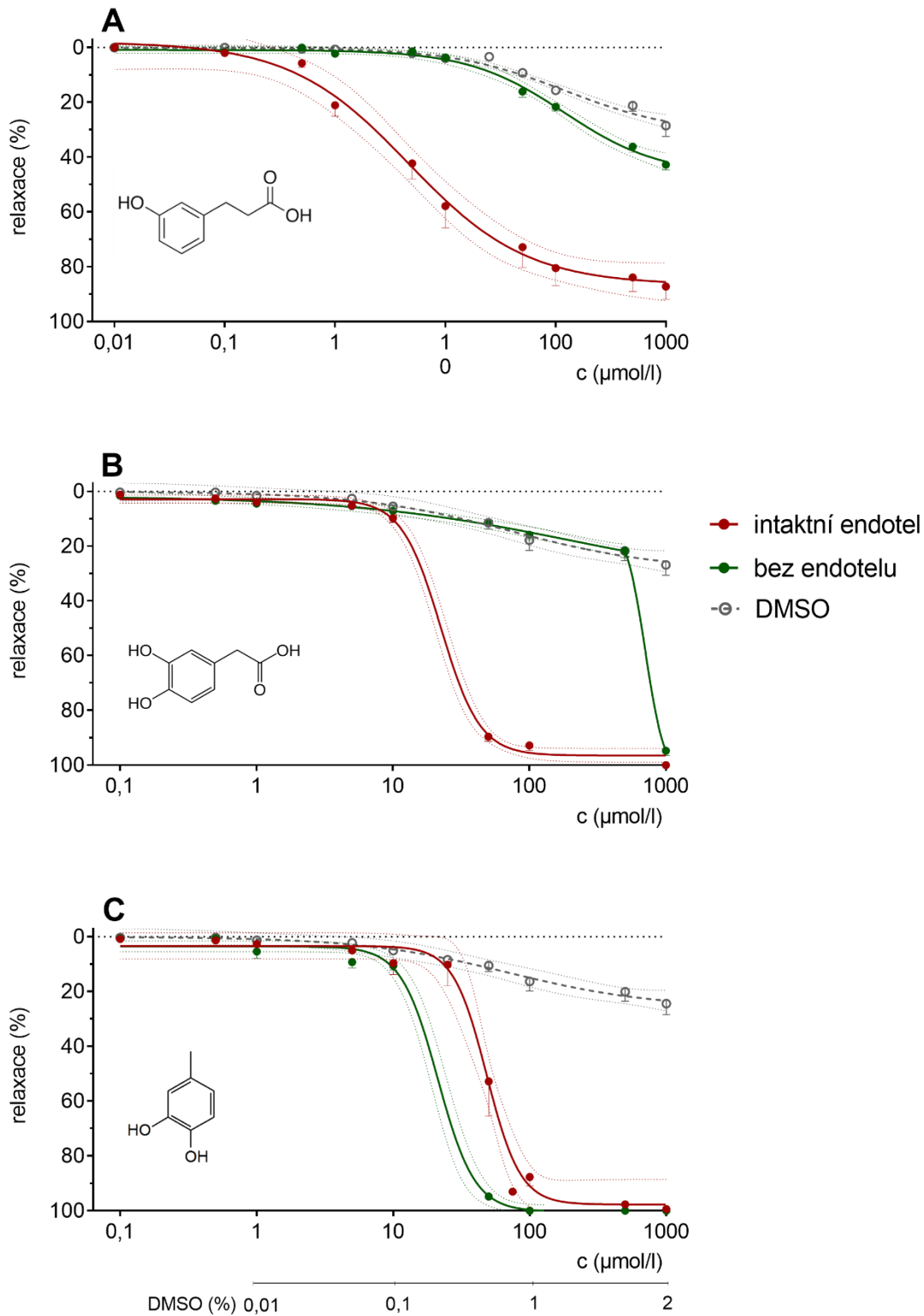
Obr.11 Hodnoty EC₅₀ vasodilatační aktivity kvercetinu a vybraných metabolitů získané *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované noradrenalinem (10 μM). Hodnoty jsou vyjádřeny s 95% konfidenčním intervalem. Čtyři nejúčinnější látky jsou označeny. Upravený obrázek z publikace Najmanová (2016).

Na tři z těchto metabolitů, kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou, kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou a 4-methylkatechol, jsme se zaměřili a začali testovat možný mechanismus účinku *ex vivo* a antihypertenzní účinky *in vivo*. Čtvrtý účinný metabolit, kyselina 3-hydroxyfenyloctová, nebyl schopen navodit 100% vasorelaxaci a nebyl tak v těchto úvodních experimentech testován.

Mechanismus účinku

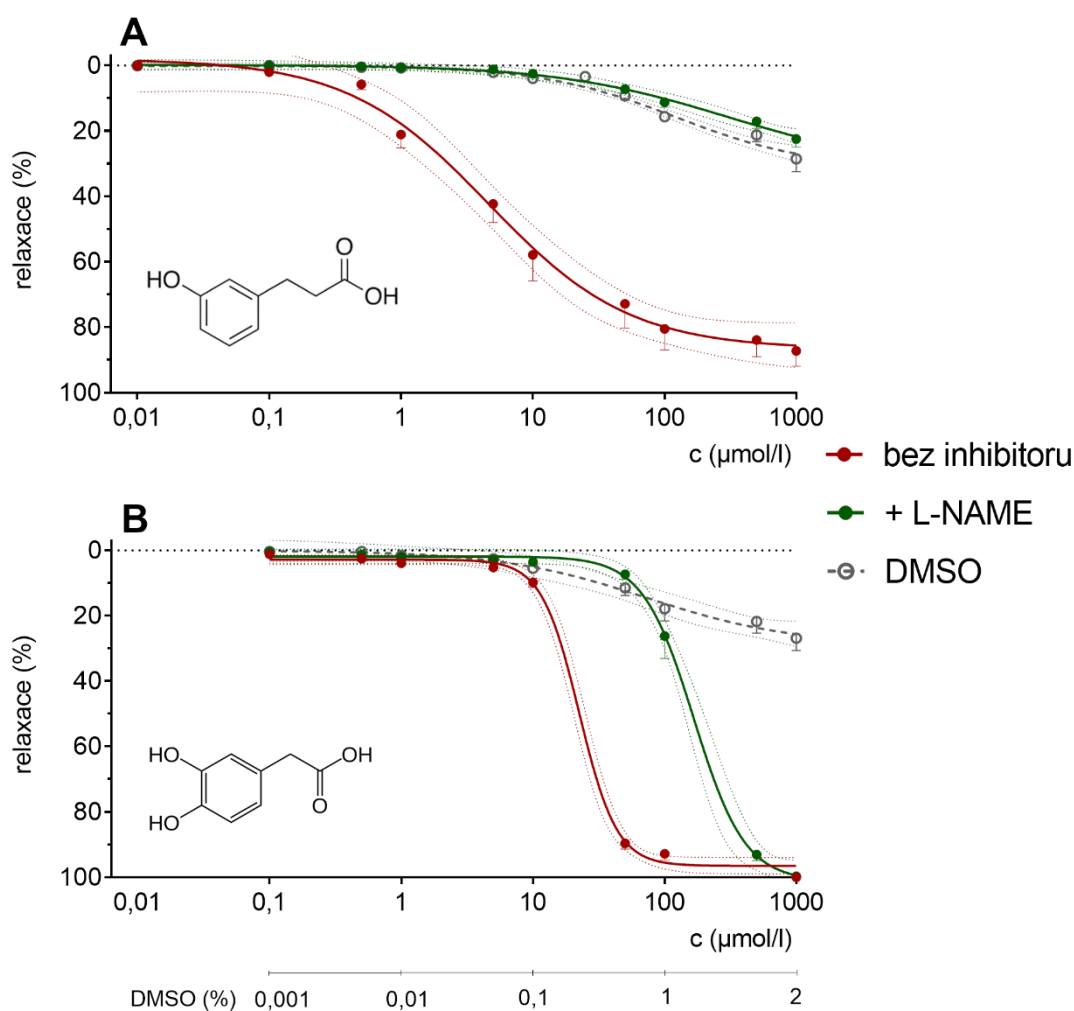
Vliv na cévní endotel

Položili jsme si otázku, zda je vasodilatační účinek spojený s vaskulárním endotelem. Za tímto účelem část pokusů proběhla na potkaních aortách zbavených funkčního endotelu. Ukázaly se rozdíly mezi látkami. Účinky kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové byly jednoznačně závislé na funkčním endotelu, naopak účinky 4-methylkatecholu na endotelu nezávisely. Vasodilatace vlivem kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové byla na endotelu závislá jen částečně, když látka dokázala v nejvyšších koncentracích navodit úplnou relaxaci i v aortách zbavených endotelu (obrázek 12).



Obr.12 Vasodilatační aktivity kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové (A), kyseliny 3,4-dihydroxyfenylaceticé (B) a 4-methylcatecholu (C) získané *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované noradrenalinem (10 μM). Aorty byly intaktní nebo zbavené funkčního endotelu. Hodnoty jsou vyjádřeny ±SEM s 95% konfidenčním intervalem. Obrázek na základě publikací Najmanová (2016) a Pourová (2018).

Tam, kde byla vasodilatace ovlivněna přítomností endotelu, se nabízela domněnka, že za účinkem stojí tvorba NO, což je hlavní EDRF ve velkých arteriích (viz kapitola 3.1.1). V další sérii pokusů jsme proto pracovali opět s potkaní aortou a použili jsme inhibitor NO syntázy L-NAME (obrázek 13). Náš předpoklad se potvrdil v případě kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové, kde byla vasodilatace takto zcela zablokována. U kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové došlo pouze k částečné blokádě, křivka ale nekopírovala tu po odstranění endotelu. Z toho usuzujeme, že tato látka účinkuje na úrovni endotelu více způsoby a částečný podíl má uvolnění NO. Ve vysokých dávkách účinkuje také mimo endotel, pravděpodobně přímo v hladkém cévním svalu.

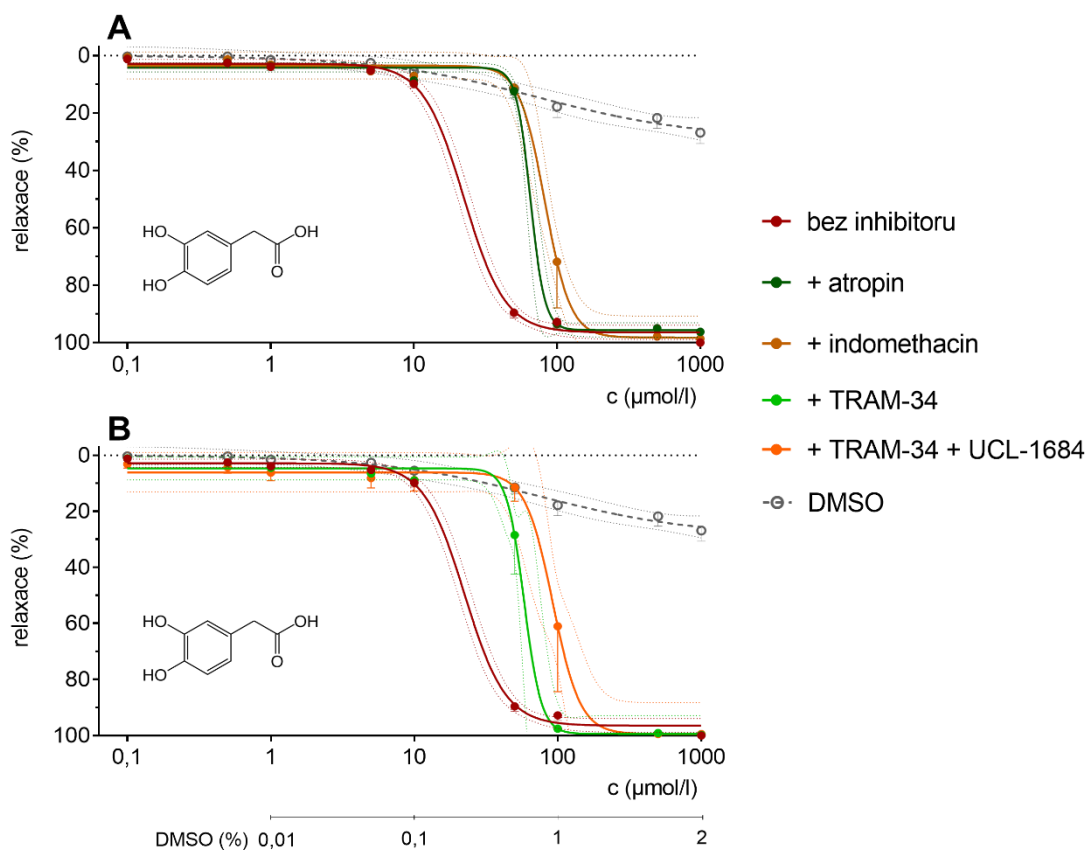


Obr.13 Hodnoty EC_{50} vasodilatační aktivity kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové (A) a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (B) získané *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované noradrenalinem (10 μM) po inkubaci s L-NAME (100 μM). Hodnoty jsou vyjádřeny ±SEM s 95% konfidenčním intervalem. Obrázek na základě publikací Najmanová (2016) a Pourová (2018).

V rámci vasodilatace prostřednictvím endotelu jsme ověřovali i další možné mechanismy. Antagonismus na muskarinových receptorech, zablokování cyklooxygenázy a membránových kanálů SK_{Ca} a IK_{Ca} byly postupně otestovány za použití atropinu, indomethacinu, UCL-1684 a TRAM-34. Účinek **kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové** nebyl spojen s žádným s těchto dějů (část výsledků dosud nepublikována). Jejím dominantním a možná jediným mechanismem vasodilatace je pravděpodobně uvolnění NO endotelem. Není zřejmé, jak kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová aktivuje NO syntázu. Díky charakteru molekuly (pK_a=4,21) a fyziologickému pH=7,4 je průnik do buňky spíše nepravděpodobný. Do úvahy připadají membránové GPCR. Vzhledem k neúčasti cyklooxygenázy a endoteliálních kanálů SK_{Ca} a IK_{Ca} není pravděpodobný předcházející nárůst hladiny Ca²⁺ v cytoplasmě endoteliální buňky a tím pádem působení na receptor typu G_q anebo na TRP kanály. Látka by mohla působit prostřednictvím receptorů typu G_s, po jejichž aktivaci dochází k posttranslační fosforylaci eNOS na Ser1177 za účasti HSP90 a zvýšení produkce NO. Vliv na receptory typu G_i nelze vyloučit, nicméně agonisté působí dvojím způsobem podle dávky. Např. 5-HT působí v nižších koncentracích na endotelu vasodilatačně, ve vyšších vyvolává vasokonstrikci přímým účinkem na hladký sval [268]. Vzhledem k tomu, že kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová byla podávána v širokém rozmezí koncentrací (100 nM – 1 mM) a účinek byl stále vasodilatační, je vliv na receptory G_i méně pravděpodobný.

Podobně jsme postupovali u **kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové**. Tam byla účast endoteliálních M receptorů, cyklooxygenázy a membránových kanálů SK_{Ca} a IK_{Ca} naopak prokázána (obrázek 14). Cyklooxygenáza umožňuje vznik vasodilatačních prostaglandinů, zejména PGI₂, který následně působí prostřednictvím receptorů IP₁ (typ G_s) na svalové buňce. Kanály SK_{Ca} se významně podílejí na vzniku hyperpolarizace PM endoteliální buňky. Nacházejí se v blízkosti MEGJ a to usnadňuje zvýšení rozdílů membránových potenciálů i v svalové buňce. O kanálech SK_{Ca} je také známo, že pokud se účastní vasodilatace, je aktivní i NO syntáza [259], což je v souladu s našimi výsledky. Z pokusů s L-NAME vyplývá, že kyselina 3,4- dihydroxyfenyloctová v endotelu vyvolává i na NO nezávislou vasodilataci; to by odpovídalo aktivitě kanálů IK_{Ca} [259]. Aktivní kanály SK_{Ca} a IK_{Ca} by také mohly prostřednictvím vzestupu extracelulárního K⁺ aktivovat membránové kanály K_{ir} a Na⁺/K⁺ ATPázu na hladkém svaly, zvyšovat rozdíl membránových potenciálů a působit vasodilatačně [281]. Protože jsme pracovali s aortou, tak toto působení považujeme za možné, i když méně významné. Jeho význam by ale mohl zásadně vzrůst v nejmenších odporových arteriích a stát se dokonce zásadním [282]. Tyto studie jsme zatím neprovedli. Muskarinové receptory M₃ fyziologicky aktivuje acetylcholin, který je dnes řazen mezi EDRF, a předpokládá se jeho lokální produkce endotelem a autokrinní

působení [170]. U kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové považujeme její vliv na M receptory za méně významný: 1) ze všech testovaných mechanismů měla blokáda atropinem nejmenší vliv; 2) acetylcholin jako EDRF je zejména spojován s patologickými stavy (viz kapitola 3.1), především hypertenzí, a také s hypotermií [170]. V našem pokusu jsme pracovali s tkání zdravých zvířat za teploty 37 °C. Kromě toho na rozdíl od periferních cév, aorta nebývá vystavena teplotním výkyvům a je otázkou, do jaké míry se tento mechanismus reálně uplatňuje. Z výsledků vyplývá ještě jedna skutečnost: relaxace zprostředkovaná NO začala od koncentrace kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové vyšší než 10 μM, zatímco ostatní děje v endotelu navodila až koncentrace vyšší než 50 μM. To naznačuje, že koncentrace Ca²⁺ pro aktivaci eNOS by mohla být o něco nižší, než např. pro aktivaci cPLA₂ [283]. Vliv mimo endotel, pravděpodobně přímo na hladký sval, se projevil až od koncentrace 0,5 mM a je tak otázkou, zda je relevantní *in vivo* podmínkách.



Obr.14 Hodnoty EC_{50} vasodilatační aktivity kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové získané *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované noradrenalinem (10 μM) po inkubaci s atropinem (50 μM) nebo s indomethacinem (10 μM) (A) a s TRAM-34 (10 μM) a UCL-1684 (1 μM) (B). Hodnoty jsou vyjádřeny ±SEM s 95% konfidenčním intervalem. Obrázek na základě publikace Pourová (2018).

Při vasodilataci kyselinou 3,4-dihydroxyfenyloctovou se tedy na úrovni endotelu zapojuje více dějů. Protože došlo k současné aktivaci tvorby NO, aktivaci cyklooxygenázy a kanálů SK_{Ca} a IK_{Ca}, tak je pravděpodobný předchozí nárůst hladiny Ca²⁺ v cytosolu. Jedná se totiž o společný spouštěč všech tří dějů. Ca²⁺ může pocházet ze sarkoplazmatického retikula a z extracelulárního prostoru. Pravděpodobná je kombinace obou zdrojů, protože některé membránové kalciové kanály se řídí stavem vnitřních zásob Ca²⁺. Z prezentovaných výsledků nelze přesně určit, jak by kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová mohla primárně spouštět nárůst Ca²⁺. Hodnota pK_a=3,61 řadí látku mezi silnější kyseliny a za fyziologického pH bude významně ionizovaná. Možným mechanismem by mohla být aktivace membránového receptoru G_q, která spouští eflux Ca²⁺ ze sarkoplazmatického retikula prostřednictvím IP₃, spouští vstup externího Ca²⁺ pomocí SOCE a také za účasti DAG dochází k aktivaci některých TRP kanálů. Zvýšená hladina Ca²⁺ aktivuje cytoplazmatickou PLA₂, což spouští tvorbu kyseliny arachidonové a vznik PGI₂, i zvyšuje aktivitu NO syntázy. Alternativně by za primárním nárůstem Ca²⁺ mohla stát přímá aktivace některých TRP kanálů na endoteliální membráně, účast na vasodilataci byla dosud popsána u TRPC3, TRPC4, TRPV1, TRPV3, TRPV 4 a TRPA1 [10].

Pro úplnost jsme provedli blokádu NO syntázy, M receptorů, cyklooxygenázy a endoteliálních SK_{Ca} a IK_{Ca} kanálů i v pokusech s **4-metylkatecholem**. Tyto blokády neměly žádný vliv a potvrdilo se, že vasodilatace navozená 4-metylkatecholem na endotelu nezávisí.

Vliv na hladký sval

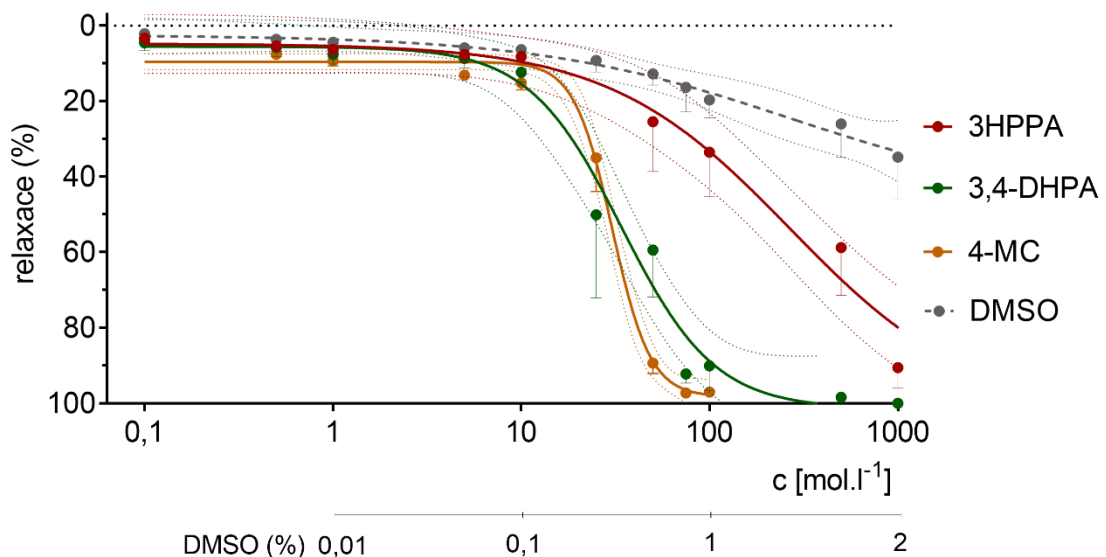
Vasodilatace může být navozena rovněž přímým účinkem na buňky hladkého svalu cév. Ze tří námi testovaných látek připadají do úvahy kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová se svým částečně na endotelu-nezávislým účinkem, a 4-metylkatechol. U **kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové** je vzhledem k chemickému charakteru pravděpodobnější membránové působení. Mohlo by se jednat o agonismus na membránových receptorech typu G_s, který by prostřednictvím proteinkinázy A inaktivoval kinázu lehkého myozinového řetězce a aktivoval membránové kanály pro K⁺, zejména BK_{Ca}. Další možností by bylo ovlivnění TRP kanálů. Účast na vasodilataci byla na hladkém svalu zatím potvrzena pro TRPV4 a TRPA1 [10], mezi aktivátory těchto kanálů patří např. EETs. Kdyby kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová opravdu účinkovala tímto způsobem, bylo by to v souladu i s působením na endotel, kde se rovněž nacházejí kanály TRPV4 a TRPA1 a pojí se také s vasodilatací. Další možností by byla přímá blokáda kanálů Cav.

4-metylkatechol pravděpodobně vasodilatuje pouze přímým působením na hladký sval. Pokud jsou jeho účinky membránové, tak možné mechanismy jsou stejné pro kyselinu

3,4- dihydroxyfenyloctovou. Tento fenol má $pK_a=9,9$ a za fyziologického pH by tak mohl pronikat do buňky hladkého svalu. Tím pádem by mohl zasáhnout do nitrobuňčné vasodilatační kaskády. Do úvahy připadají například vliv na aktivitu proteinkináz A a G anebo na ATPázu SERCA na sarkoplazmatickém retikulu. Tuto možnost podporuje fakt, že 4-methylkatechol zasahuje do intracelulárního pohybu vápníku v krevních destičkách, a je proto možné, že obdobně působí i v hladkém cévním svalu [284]. K ověření těchto možností jsou potřeba další pokusy.

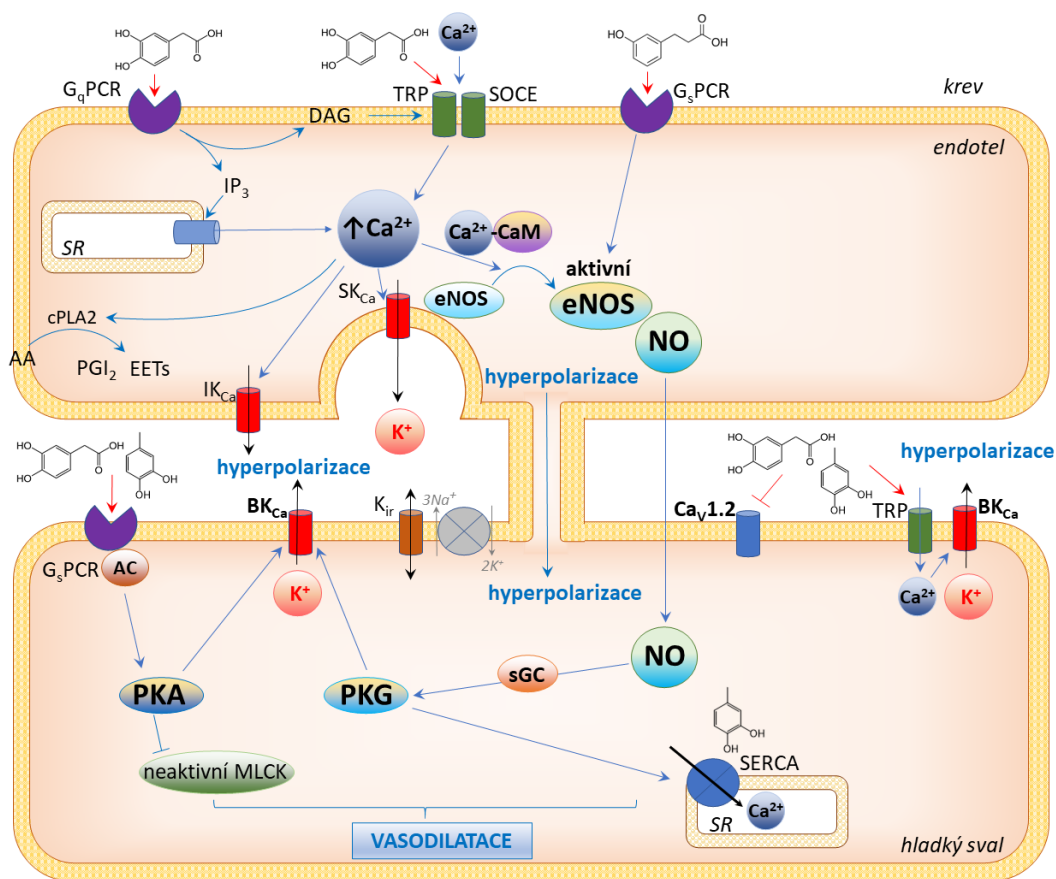
Vliv na arteriolu *ex vivo*

Metabolity jsme následně testovali *ex vivo* na prekontrahovaných *a.renalis* a *a.mesenterica*, jako příkladech rezistentních arteriol, pomocí myografu. Všechny tři látky byly schopné navodit vasodilataci (obrázek 15). Na izolované aortě byla účinnost v pořadí kyselina 3- (3-hydroxyfenyl)propionová > kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová > 4-methylkatechol, nejúčinnější kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová byla o řád účinnější než parentní kvercetin. V pokusech s malou cévou byla tato látka překvapivě o řád méně účinná než kyselina 3,4- dihydroxyfenyloctová a 4-methylkatechol. Tento výsledek je důležitý, protože pro kardiovaskulární systém a tlak krve mají daleko větší význam malé odporové arterie než velké elastické. Úloha endotelu byla u všech tří látek stejná jako na aortě, tedy kyseliny 3- (3- hydroxyfenyl)propionová a 3,4-dihydroxyfenyloctová dilatovaly malé cévy za účasti endotelu, 4- methylkatechol působil na endotelu nezávisle.



Obr.15 Hodnoty EC_{50} vasodilatační aktivity kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové (3HPPA), kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (3,4-DHPA) a 4-methylkatecholu (4-MC) získané *ex vivo* na izolované arteria mesenterica potkana prekontrahované noradrenalinem (10 μ M). Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SEM s 95% konfidenčním intervalem. Obrázek na základě publikací Najmanová (2016) a Pourová (2018).

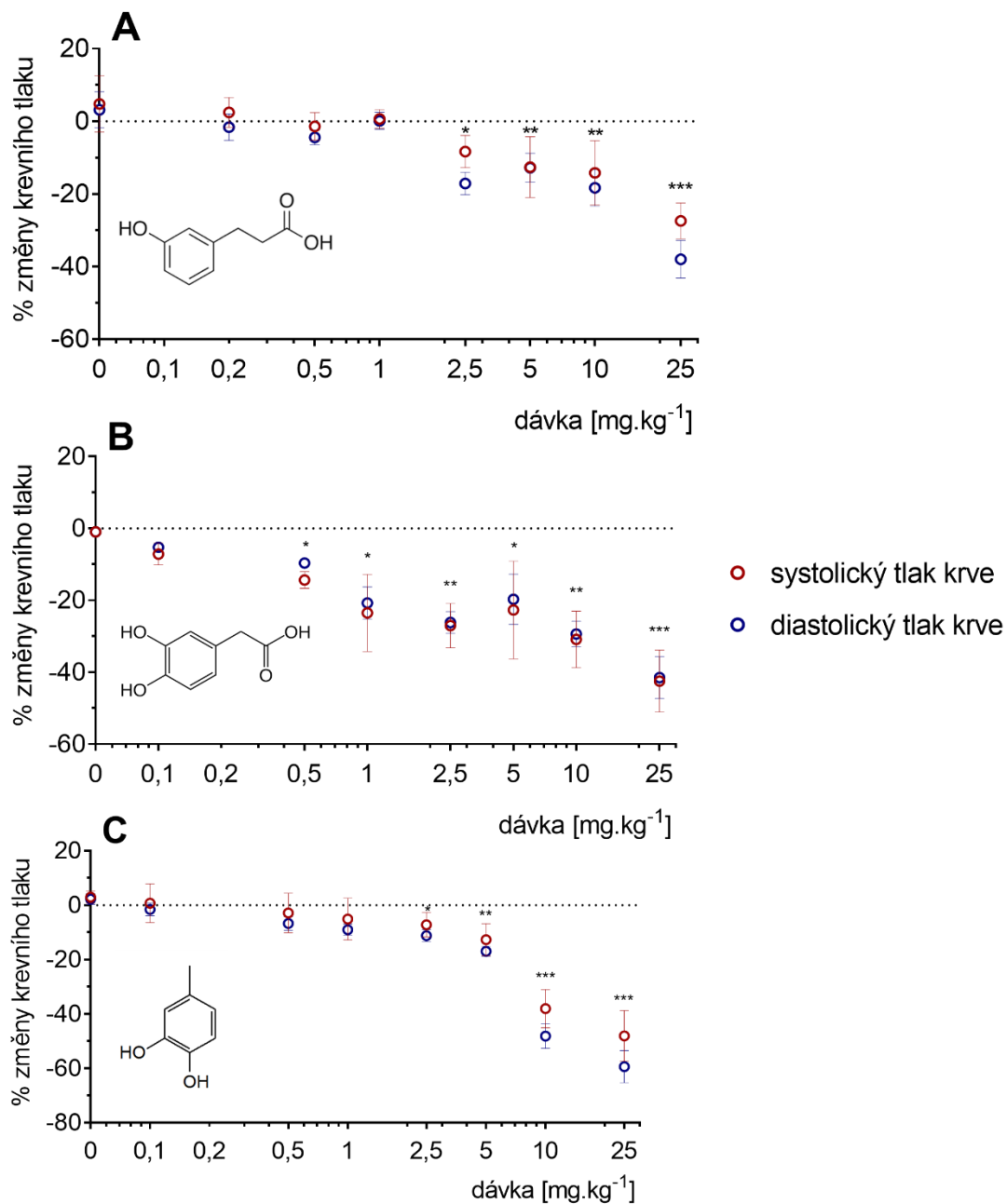
Souhrn předpokládaných mechanismů všech testovaných metabolitů ukazuje obrázek 16.



Obr.16 Možná místa vasodilatačního účinku kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové, kyseliny 3,4- dihydroxyfenylactové a 4-methylkatecholu podle výsledků pokusů *ex vivo* na izolované aortě potkana. Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová působí prostřednictvím endotelu, 4- methylkatechol přímo na hladký sval a kyselina 3,4-dihydroxyfenylactové kombinuje oba způsoby. Zkratky jsou vysvětleny v kapitolách 2-4.

Antihypertenzní účinky *in vivo*

Účinky všech tří testovaných metabolitů jsme ověřili *in vivo*. K pokusu jsme použili normotenzní potkany kmene Wistar a hypertenzní kmen SHR. Látky jsme podali nejprve *i.v.* jako **bolus**. Všechny snižovaly krevní tlak, tento účinek byl dávkově závislý a relativně krátkodobý (obrázek 17).



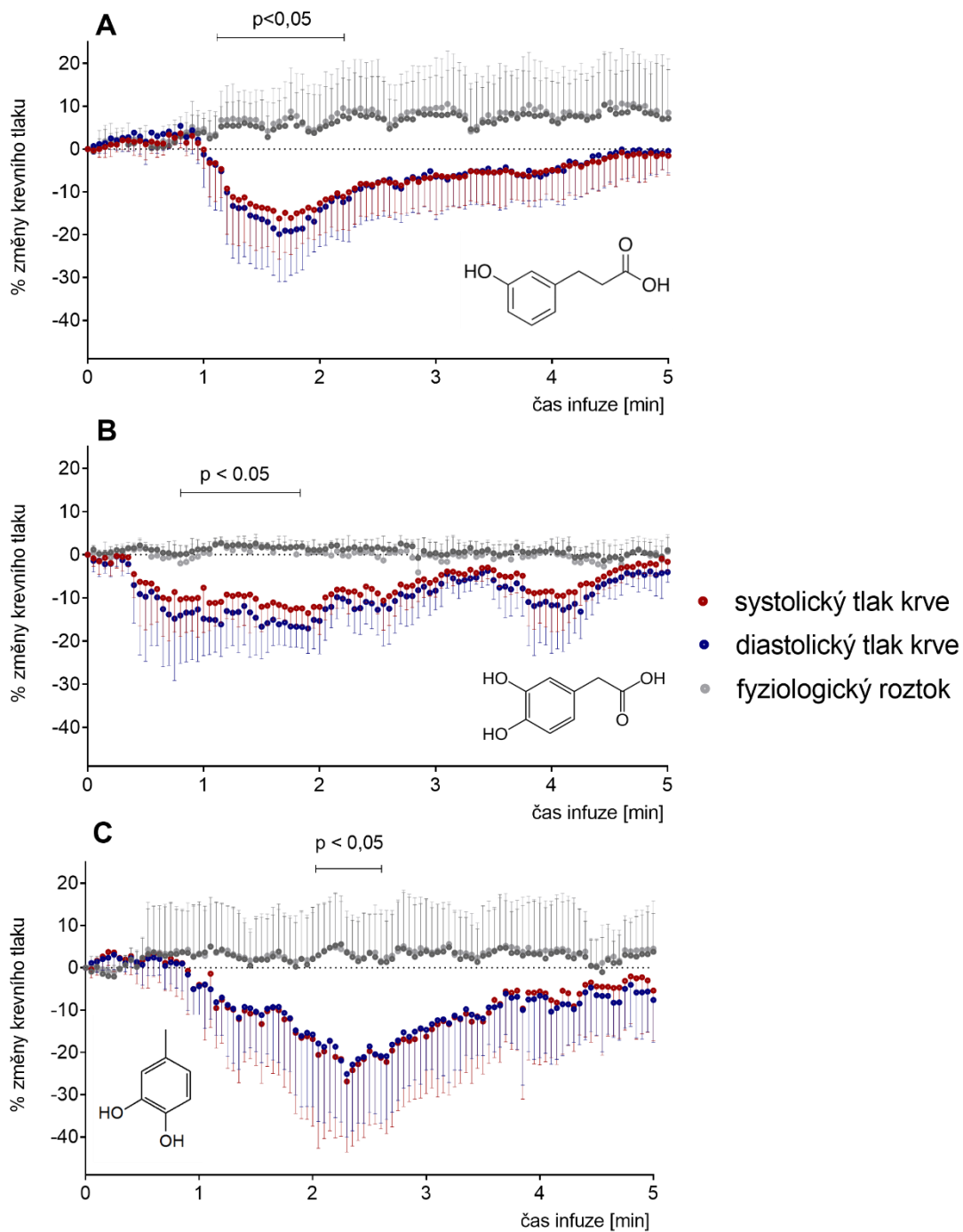
Obr.17 Změny systolického a diastolického krevního tlaku po bolusové i.v. aplikaci kyseliny 3- (3- hydroxyfenyl)propionové (A), kyseliny 3,4-dihydroxyfenylactové (B) a 4-metylkatecholu (C) normotenznímu potkanovi (vždy n=5). Hodnoty jsou vyjádřeny ± SD. Významnost je znázorněna jen pro systolický krevní tlak: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs fyziologický roztok. Obrázek na základě publikací Najmanová (2016) a Pourová (2018).

Kyselina 3,4-dihydroxyfenylactová vyvolala signifikantní pokles o půl řádu v nižší dávce (0,5 mg.kg⁻¹) než zbylé dvě látky (2,5 mg.kg⁻¹). Nejhlubší pokles krevního tlaku navodil 4- metylcatechol (54 %). Žádná z látek neměnila srdeční frekvenci. Přímý vliv na srdce je proto

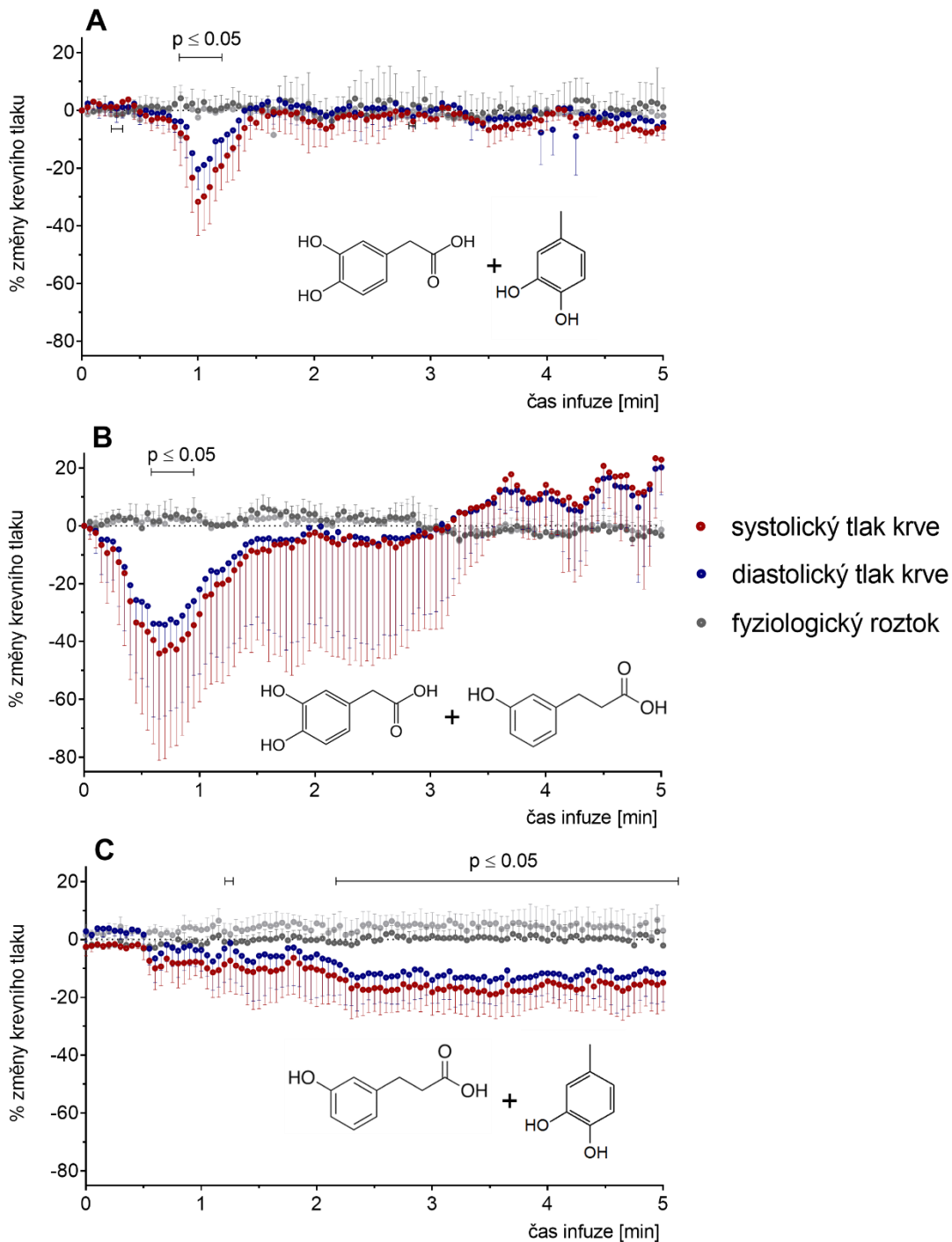
nepravděpodobný (byl také vyloučen při hlubší analýze-viz publikace Pourová (2018)) a bylo tak potvrzeno, že látky snižují krevní tlak primárně periferní vasodilací a tedy v souladu s našimi *ex vivo* výsledky. U kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové a 4-metylkatecholu tomu odpovídá také o trochu výraznější pokles diastolického než systolického tlaku. U kyseliny 3,4-dihydroxyfenylacetové byl rozsah poklesů zhruba stejný. V části pokusů *in vivo* jsme po podání testované látky aplikovali *i.v.* noradrenalin. Rozsah reakce na noradrenalin (nárůst tlaku krve a srdeční frekvence) nebyl ovlivněn, z čehož usuzujeme, že zkoumané metabolity nemají vliv na vaskulární α_1 receptory.

Malé fenolické metabolity flavonoidů vznikající v tlustém střevě se následně vstřebávají. Abychom tuto situaci napodobili, použili jsme podání **pomalou *i.v.* infuzí**. Všechny tři látky opět vyvolaly dávkově závislý pokles krevního tlaku (obrázek 18). Stejně jako u bolusového podání nejhlubší pokles krevního tlaku navodil 4-metylkatechol (maximální pokles asi o 25 %). Účinek byl krátkodobý a žádná z látek neměla vliv na srdeční frekvenci.

Protože v reálné situaci kolonické metabolity nevznikají izolovaně, ale ve směsi, rozhodli jsme se následně podávat testované metabolity v **dvojkombinaci** ve stejné celkové dávce. Opět jsme použili hypertenzní SHR potkany a *i.v.* infuzi. V souladu s předchozími výsledky, kombinace navodily dávkově závislý pokles krevního tlaku (obrázek 19). Důležité bylo, že účinek směsi kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové a 4-metylkatecholu byl dlouhodobý.



Obr.18 Změny systolického a diastolického krevního tlaku po i.v. infuzní aplikaci kyseliny 3- (3- hydroxyfenyl)propionové (A), kyseliny 3,4-dihydroxyfenylactové (B) a 4-methylcatecholu (C) normotenznímu potkanovi v dávce $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (vždy $n=6$). Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SD. Významnost vs fyziologický roztok znázorněna pro systolický krevní tlak. Obrázek na základě publikací Najmanová (2016) a Pourová (2018).



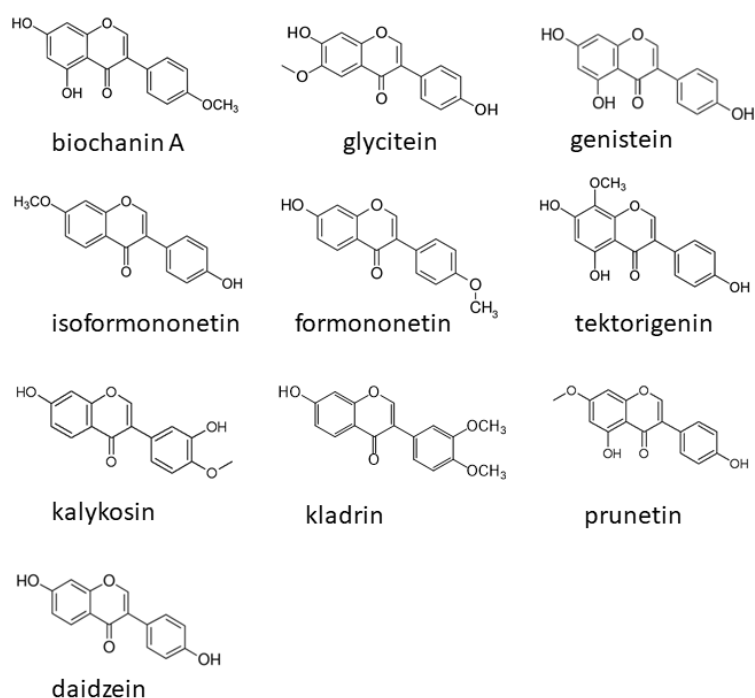
Obr.19 Změny systolického a diastolického krevního tlaku po i.v. infuzní aplikaci dvojkombinací kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové a 4-methylcatecholu (A); kyselin 3- (3-hydroxyfenyl)propionové a 3,4-dihydroxyfenyloctové (B); a kyselin 3- (3-hydroxyfenyl)propionové a 4-methylcatecholu (C) normotenznímu potkanovi (vždy $n=6$) v celkové dávce $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (A) nebo $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (B, C). Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SD. Významnost vs fyziologický roztok znázorněna pro systolický krevní tlak. Obrázek na základě publikace Najmanová (2020).

7.2. Vasodilatační účinky isoflavonů

Práce:

- Migkos T, Pourová J, Vopršalová M, Auger C, Schini-Kerth V, Mladěnka P. Biochanin A, the most potent of 16 isoflavones, induces relaxation of coronary artery through the calcium channel and cGMP-dependent pathway. *Planta Medica. Planta Med* 2020 Jul;86(10):708-716

Výsledky výše popsaných pokusů s kvercetinem a jeho metabolity nás povzbudily k testování další podskupiny polyfenolů, isoflavonů (obrázek 20). Jedná se o fytoestrogeny, které se v tradiční čínské medicíně užívají k léčbě kardiovaskulárních chorob. Tento účinek je spojován se strukturální podobností s 17- β -estradiolem a slabými estrogenními účinky [285] prostřednictvím receptorů GPER typu G_q v cévním endotelu [155, 156]. Řada prací naznačila, že mohou snižovat arteriální krevní tlak [286, 287], ale chyběla studie, která by porovnávala účinky těchto látek.

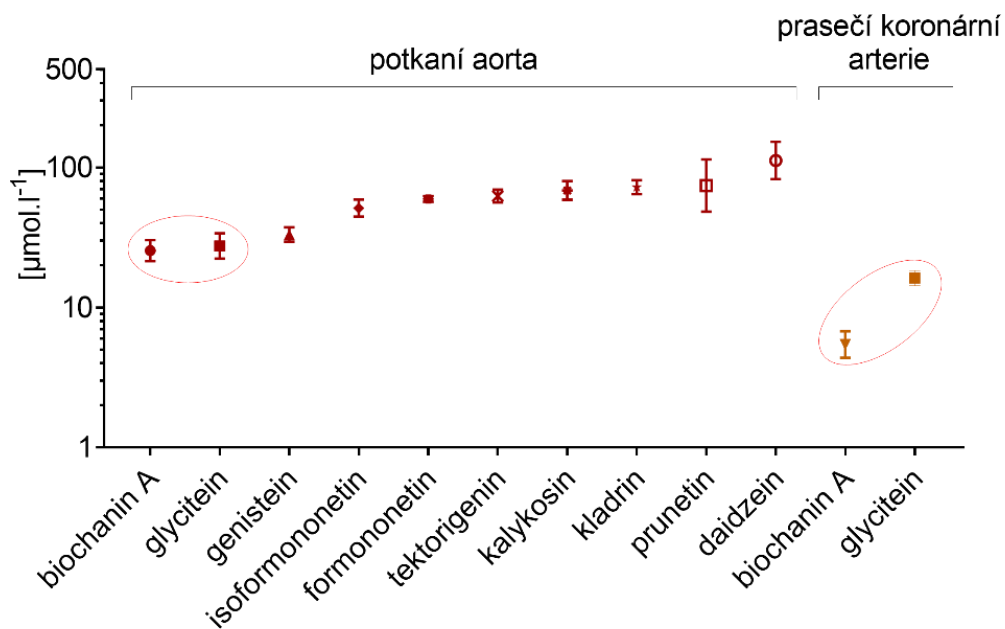


Obr.20 Isoflavony zahrnuté v screeningu vasodilatačního účinku

Screening vasodilatačního účinku

Nejprve jsme provedli **screening** vasodilatačního účinku šesti přírodních glykosidů a deseti aglykonů *ex vivo* na potkaní aortě. Bakteriální metabolity isoflavonů, jako ekvol nebo *O*-desmethylangolensin, nebyly v těchto pokusech testovány. Glykosidy byly neúčinné nebo výrazně méně účinné než odpovídající aglykony. Z aglykonů vykazovaly největší

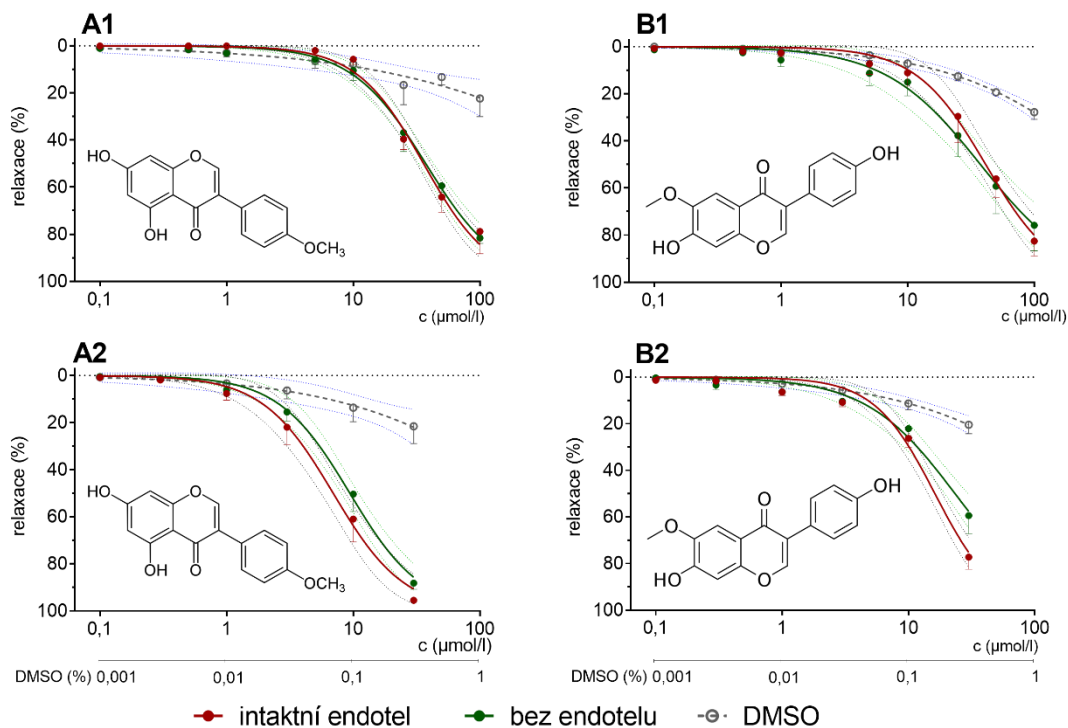
vasodilatační účinek biochanin A a glycitein ($EC_{50}=25 \mu\text{M}$ a $27 \mu\text{M}$), oba byly dávkově závislé. Tento vliv jsme následně potvrdili i na prasečích koronárních cévách, kde hodnoty EC_{50} byly ještě nižší ($EC_{50}=5 \mu\text{M}$ a $16 \mu\text{M}$). Výsledky shrnuje obrázek 21.



Obr.21 Hodnoty EC_{50} vasodilatační aktivity isoflavonových aglykonů získané *ex vivo* na izolované aortě potkana nebo prasečí koronární arterii prekontrahované noradrenalinem ($10 \mu\text{M}$). Hodnoty jsou vyjádřeny s 95% konfidenčním intervalem. Dvě nejúčinnější látky jsou označeny. Obrázek na základě publikace Migkos (2020).

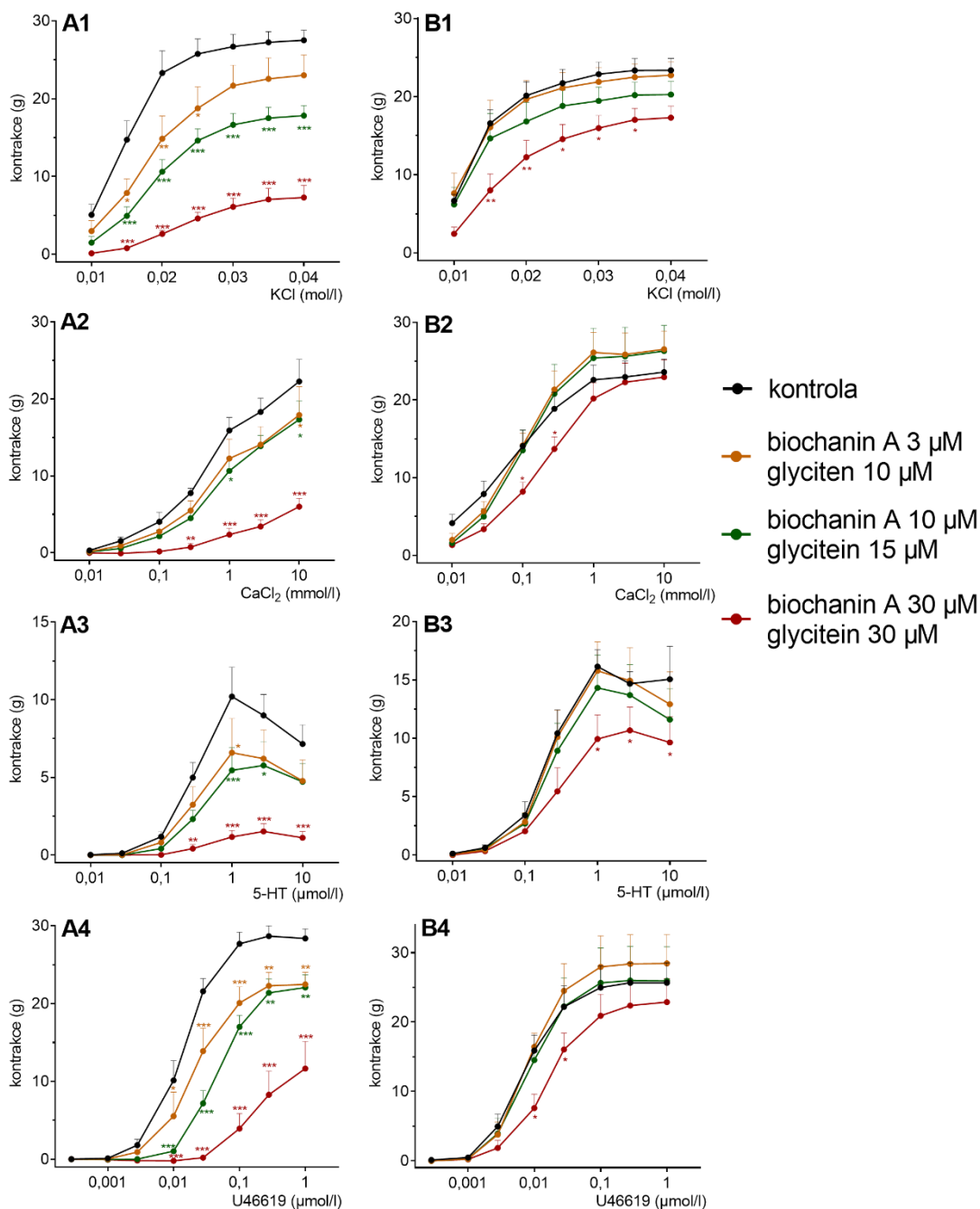
Mechanismus vasodilatačního účinku na koronární cévy

V dalším testování jsme se zaměřili na nejúčinnější látky biochanin A a glycitein. Obě látky vykazovaly vasodilatační účinek nezávislý na endotelu v obou použitých modelech (obrázek 22).



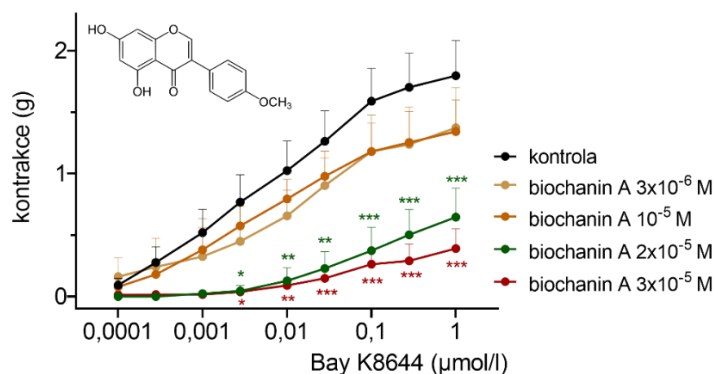
Obr.22 Vasodilatační účinek biochaninu A (A) a glyciteinu (B) ex vivo na izolované aortě potkana (1) a prasečí koronární cévě (2). Cévy byly intaktní nebo zbavené funkčního endotelu. Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SEM a s 95% konfidenčním intervalem. Obrázek na základě publikace Migkos (2020).

V další mechanistických pokusech jsme proto vždy používali prasečí koronární cévy zbavené endotelu. Nejprve jsme testovali vliv na kontrakci navozenou čtyřmi různými vazokonstrikčními podněty (KCl, CaCl₂, 5-HT a tromboxanový analog PGH₂ U46619). Zvolené podněty působí odlišnými mechanismy. Extracelulární KCl ve vyšší koncentraci snižuje rozdíl membránových potenciálů, což vede k otevření napětově řízených kanálů Cav a vstupu Ca²⁺. Vstup Ca²⁺ podporuje i extracelulární CaCl₂. Naproti tomu 5-HT a U46619 vyvolávají vazokonstrikci prostřednictvím membránových receptorů spojených s G_q proteinem. Biochanin A byl schopný signifikantně omezit kontrakci koronárních cév již v dávce 3 μM, zatímco glycitein i v nejvyšší testované koncentraci (30 μM) účinkoval pouze parciálně (obrázek 23). Z tohoto důvodu jsme se v dalších pokusech zaměřili jen na biochanin A.



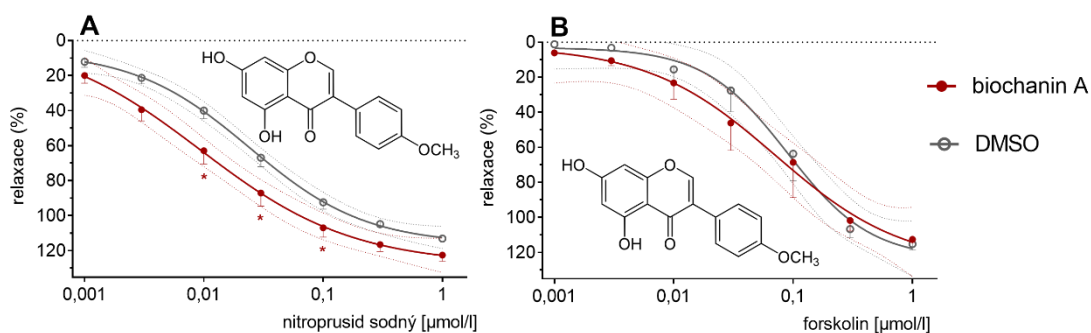
Obr.23 Kontrakce prasečí koronární cévy navozená čtyřmi různými podněty: KCl (1), CaCl_2 (2), 5-HT (3) a U46619 (4) blokována různými koncentracemi biochaninu A (A) nebo glyciteinu (B). Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs kontrola. Obrázek na základě publikace Migkos (2020).

Biochanin A dokázal účinně inhibovat vasokonstrikci ve všech případech. Domníváme se proto, že jeho účinek spočívá v zásahu do vasokonstrikční kaskády uvnitř svalové buňky. Protože společným mechanismem konstrikce hladkého cévního svalu je nárůst intracelulární koncentrace Ca^{2+} , rozhodli jsme se nejprve ověřit vliv biochaninu A na membránové kanály $\text{Ca}_v1.2$. Inhibice se potvrdila v koncentraci vyšší než 10 μM a byla dávkově závislá (obrázek 24).

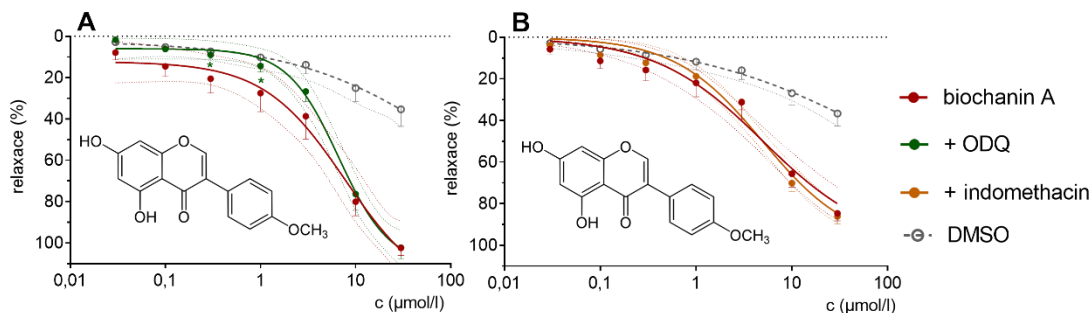


Obr.24 Kontrakce prasečí koronární cévy navozená BayK 8644 a blokována různými koncentracemi biochaninu A. Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs kontrola. Obrázek na základě publikace Migkos (2020).

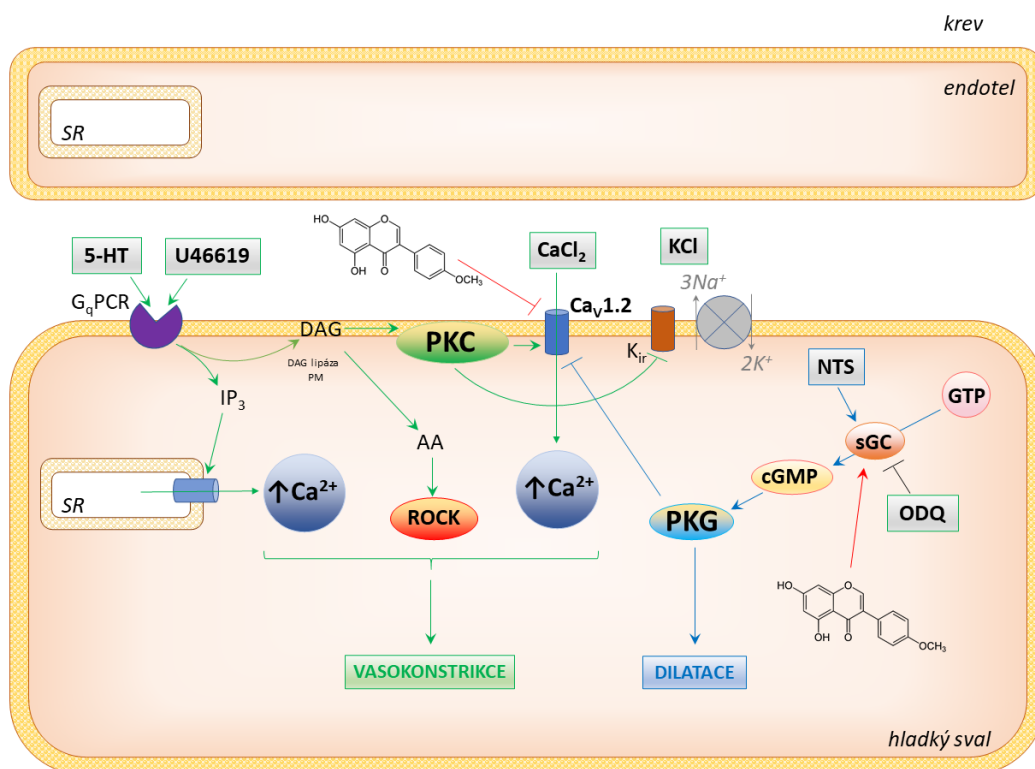
Na koronární cévě byl biochanin A ale vasodilatačně účinný v nižší koncentraci ($EC_{50} = 5 \mu M$), což naznačuje přítomnost ještě dalšího mechanismu. Hodnota $pK_a = 6,55$ nevylučuje za fyziologického pH průnik do buňky. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli testovat vliv na nitrobuněčnou vasodilatační kaskádu. Ukázalo se, že biochanin A dokáže potencovat vasodilataci navozenou aktivátorem sGC, nitroprusidem sodným, a naopak účinek biochaninu A inhibuje blokátor sGC, ODQ (obrázky 25 a 26). Biochanin A by proto v koronárních cévách mohl v nižších koncentracích (významný vliv již od $0,3 \mu M$) podporovat tvorbu cGMP a aktivaci vasodilatační PKG. Od koncentrace biochaninu A $3 \mu M$ byl vliv této blokády nesignifikantní a při $10 \mu M$ zcela zanedbatelný, což by odpovídalo nástupu účinku na kanálech $Ca_v1.2$. Na vasodilataci navozenou biochaninem A neměl žádný vliv inhibitor cyclooxygenázy, indomethacin. Obdobně biochanin A neovlivnil vasodilataci navozenou aktivátorem adenylátcyklázy, forskolinem (obrázky 25 a 26). Významné vasodilatační působení biochaninu A přes prostacyklin nebo PKA je proto nepravděpodobné. Možná místa účinku biochaninu A shrnuje obrázek 27.



Obr.25 Vliv preinkubace s biochaninem A na relaxaci noradrenalinem ($10 \mu M$) prekontrahované prasečí koronární cévy navozené nitroprusidem sodným (A) nebo forskolinem (B). Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SEM a s 95% konfidenčním intervalem. * $p < 0,05$ vs kontrola. Obrázek na základě publikace Migkos (2020).



Obr.26 Vliv inhibice sGC (A) a cyklooxygenázy (B) na relaxaci noradrenalinem (10 μ M) prekontrahované prasečí koronární cévy navozené biochaninem A. Cévy byly preinkubovány s ODQ (1 μ M) nebo s indomethacinem (10 μ M). Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SEM a s 95% konfidenčním intervalem. * $p < 0,05$ vs cévy bez inkubace. Obrázek na základě publikace Migkos (2020).



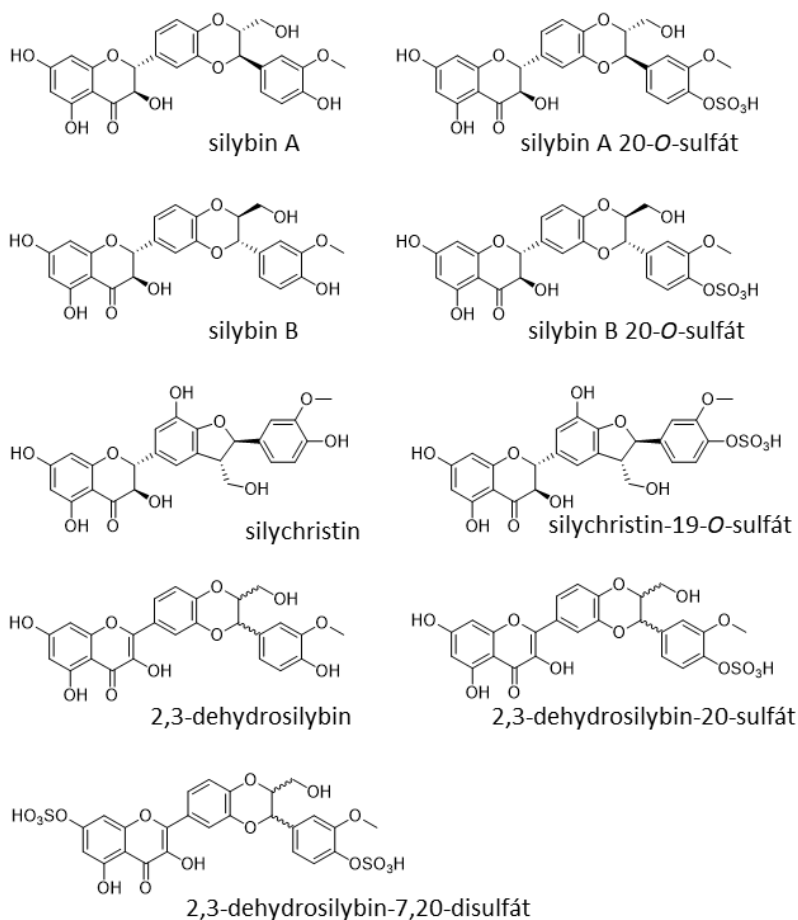
Obr.27 Možná místa vasodilatačního účinku biochanininu A podle výsledků pokusů *ex vivo* na izolované prasečí koronární cévě. Biochanin A působí přímo na hladký sval. Zkratky jsou vysvětleny v kapitolách 2-4.

7.3. Vasodilatační účinky flavonolignanů silymarinu

Práce

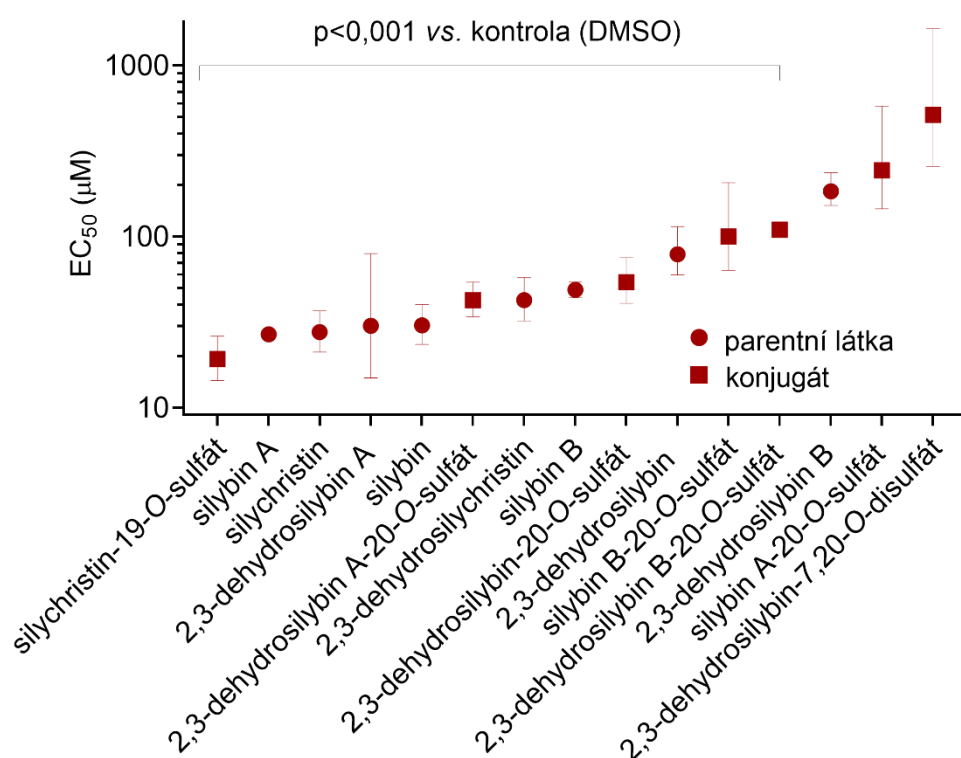
- Pourová J, Applová L, Macáková K, Vopršalová M, Migkos T, Bentanachs R, Biedermann D, Petrásková L, Tvrđý V, Hrubša M, Karličková J, Křen V, Valentová K, Mladěnka P. The effect of silymarin flavonolignans and their sulfated conjugates on platelet aggregation and blood vessels *ex vivo*. *Nutrients*. 2019; 11, 2286

V rámci zkoumání účinků přírodních polyfenolů jsme testovali také silymarin. Jedná se o směs látek, kde dominují flavonolignany (70-80 %). Jde o látky odvozené o flavonoidů. Silymarin je používán zejména pro své hepatoprotektivní účinky, ale farmakologické působení je širší včetně dokumentovaného pozitivního vlivu na metabolický syndrom [288]. Na potkaní aortě *ex vivo* jsme provedli **screening** vasodilatačního účinku osmi hlavních flavonolignanů (obrázek 28). Protože konjugace je hlavní cestou metabolisme, testovali jsme zároveň sedm konjugátů, a to šest sulfátů a jeden disulfát.

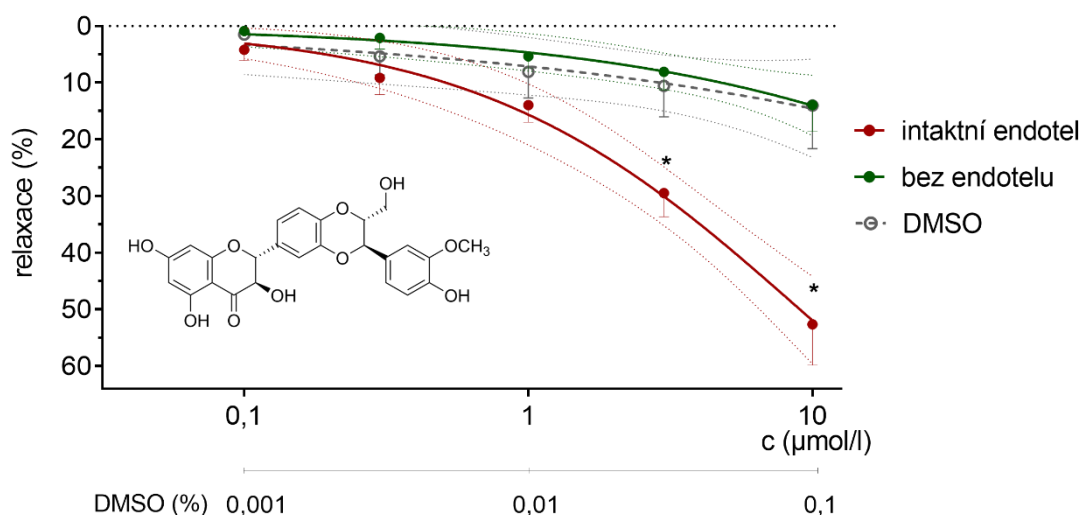


Obr.28 Flavonolignany silymarinu a jejich sulfátové konjugáty zahrnuté v screeningu vasodilatačního účinku

Hlavní obsahová látka silymarinu (~30 %), silybin A, byl zároveň nejúčinnější vasodilatátor ($EC_{50}=26 \mu\text{M}$) a jeho účinek byl závislý na přítomnosti endotelu (obrázky 29 a 30). Sulfáty byly většinou svým vasodilatačním účinkem srovnatelné odpovídajícím parentním látkám. Tato informace je důležitá, protože v plazmě se silymarinové flavonoignany nacházejí převážně ve formě konjugátů. Vasodilatační účinek jednoznačně závisel na stereochemii molekuly. Diastereomery B byly obecně účinnější, nežli diastereomery A. V rámci screeningu jsme zkoušeli i možnou potenciaci účinků mezi stereoizomery, ta se ale neprokázala.



Obr.29 Hodnoty EC_{50} vasodilatační aktivity flavonolignanů silymarinu a jejich sulfátových konjugátů získané *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované fenylefrinem ($1 \mu\text{M}$). Hodnoty jsou vyjádřeny s 95% konfidenčním intervalem. Obrázek na základě publikace Pourová (2019).



Obr.30 Hodnoty EC_{50} vasodilatační aktivity silybinu A získané *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované fenylefrinem ($1 \mu\text{M}$). Aorty byly intaktní nebo zbavené funkčního endotelu. Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SEM a s 95% konfidenčním intervalem. Obrázek na základě publikace Pourová (2019).

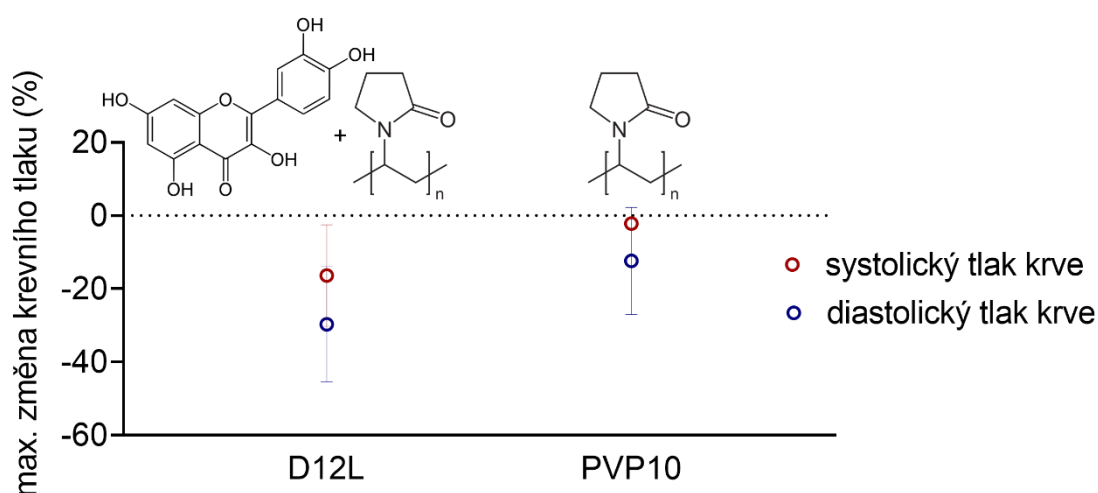
7.4. Vasodilatační účinky parentního kvercetinu

Práce

- Porcu EP, Cossu M, Rassu G, Giunchedi P, Cerrib G, Pourová J, Najmanová I, Migkos T, Pilařová V, Nováková L, Mladěnka P, Gavini E. Aqueous injection of quercetin: An approach for confirmation of its direct *in vivo* cardiovascular effects. *Int J Pharm* 2018; Feb 21;541(1-2):224-233

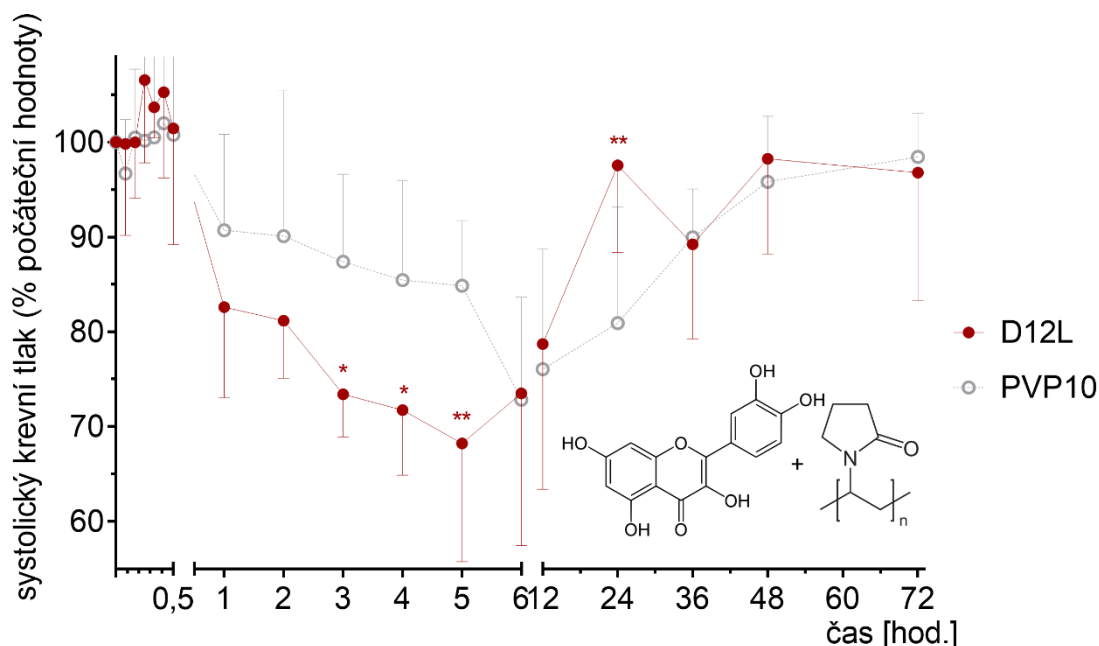
I když se v naší práci věnujeme hlavně vasoaktivitě metabolitů, nevylučujeme ani vliv původních polyfenolických látek. Jak již bylo zmíněno, přírodní polyfenoly mají obecně malou biodostupnost, která souvisí s velmi malou rozpustností ve vodě. To se týká i jednoho z nejrozšířenějších flavonoidů v potravě, kvercetinu. Jeho rozpustnost ve vodě je výrazně limitována a činí $2,15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ při $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Jednou z možností, jak zvýšit jeho rozpustnost ve vodě, je tvorba disperze s vhodným polymerem. Ve spolupráci s kolegy z Univerzity v Sassari, byla připravená disperze s polyvinylpyrrolidonem D12L, která umožňuje rozpustit přibližně 45 mg kvercetinu na mililitr volného roztoku. K ověření vlivu kvercetinu na krevní tlak jsme použili *i.v.* podání, které obchází absorpci a tvorbu metabolitů mikroflórou. U normotenzních anestezovaných potkanů došlo po bolusové aplikaci k poklesu systolického a zejména diastolického krevního tlaku, což naznačuje vasodilatační účinek (obrázek 31). Variabilita mezi

zvíraty však byla značná, účinná dávka se pohybovala mezi 0,1-2,5 mg.kg⁻¹. Pokles krevního tlaku navozený v paralelních kontrolních pokusech samotným PVP byl znatelně nižší.



Obr.31 Maximální změna systolického a diastolického krevního tlaku po bolusové i.v. aplikaci disperze kvercetinu s polyvinylpyrrolidonem (D12L) a samotného polyvinylpyrrolidonu (PVP) (n=4 a 2). Hodnoty jsou vyjádřeny ± SD. Obrázek na základě publikace Porcu (2018).

Následně jsme u spontánně hypertenzních potkanů zkoumali dlouhodobý účinek po jednorázovém i.v. podání 5 mg.kg⁻¹ pomocí opakovaného neinvazivního měření krevního tlaku manžetou na ocase. V tomto případě byl zjištěn prolongovaný pokles, který vrcholil 5 hodin od aplikace a dosáhl snížení asi o 30 % původní hodnoty (obrázek 32). Samotný PVP rovněž snižoval krevní tlak, ale znatelně méně. Souběžně probíhající farmakokinetická studie ukázala velmi rychlý pokles plazmatické hladiny kvercetinu během prvních 15 minut a hlavními identifikovanými metabolity byly isorhamnetin a kvercetin-3-O-glukuronid. Tyto látky se proto mohly podílet na pozorovaném účinku. Maximální plazmatické koncentrace dosáhly u kvercetinu hodnotu mezi 15-20 μM, u metabolitů jednotky μM.



Obr.32 Účinky disperze kvercetinu s polyvinylpyrrolidonem (D12L) na krevní tlak bdělého spontánně hypertenzního potkana v dávce 65 mg.kg^{-1} (odpovídá 5 mg.kg^{-1} kvercetinu). Hodnoty jsou vyjádřeny \pm SD. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs samotný polyvinylpyrrolidon. Obrázek na základě publikace Porcu (2018).

7.5. Zhodnocení dosažených výsledků

Přírodní polyfenolické látky jsou spojovány s různými terapeutickými účinky včetně účinků na kardiovaskulární systém a KVO [270, 289]. Klinické studie se typicky zaměřují na příjem potravy bohaté na přírodní polyfenoly a na kardiometabolické biomarkery [290]. Pozitivní vliv je v klinických studiích sice všeobecně akceptován, nicméně přesvědčivý důkaz komplikuje řada skutečností. Zejména: (1) dostupné studie nejsou metodicky jednotné, což přispívá k variabilitě výsledků, (2) příjem dietou se obecně nespolehlivě měří (časté je použití dotazníků), (3) výsledky ovlivňují další důležité faktory jako jsou regionální odlišnosti v životním stylu nebo velké interindividuální rozdíly např. v přítomné gastrointestinální mikroflóře, a konečně (4) samotná skupina polyfenolů je velmi rozmanitá, účinky jednotlivých zástupců nebo různých směsí se od sebe mohou lišit. Stanovení konkrétních dietních doporučení je proto obtížné. V optimálním případě by mělo být připraveno na míru pro konkrétního jedince nebo populaci, což naráží na realizovatelnost v praxi. Za hranici prokazatelného příznivého vlivu na kardiovaskulární onemocnění a kardiovaskulární mortalitu je někdy považován příjem celkových polyfenolů nad $\sim 500 \text{ mg/den}$ [270]. Pozitivní účinky přírodních polyfenolů by mohl přesvědčivěji prokázat základní výzkum, ale i zde narážíme na nejednotnou metodiku a široké spektrum testovaných látek nebo směsí [291-293], což ztěžuje interpretaci výsledků. Dalším podstatným problémem

je, že ne všechny klinické a základní studie zohledňují dva důležité farmakologické rysy přírodních polyfenolů: obecně malou biodostupnost a vyšší míru metabolizace [294].

Zde předkládané práce patří do základního výzkumu. Sledují vliv přírodních polyfenolických látek nebo jejich metabolitů na kardiovaskulární systém, zejména vasodilatační účinky. Vzhledem k nízké biodostupnosti jsme pracovali s hypotézou, že testované látky mohou mít účinné metabolity, které se významně podílejí na farmakologickém účinku. Z tohoto důvodu byly postupně testovány parentní glykosidy, aglykony a vybrané metabolity. Protože neexistovaly přesvědčivé informace ve prospěch metabolitů první nebo druhé fáze, testovali jsme zástupce obou skupin. Práce probíhala na třech úrovních: 1) úvodní screening *ex vivo*; 2) ověření účinků *in vivo* účinků u neúčinnějších látek; a 3) hledání možného mechanismu vasodilatačního účinku těchto látek *ex vivo*. V předkládané habilitační práci jsou zahrnuty tři typy látek strukturálně blízkých látek: flavonoly, isoflavony a flavonolignany.

Screening vasodilatačního účinku

První a zatím nejrozsáhleji testovanou skupinou byly flavonoly, konkrétně kvercetin, jeho glykosid rutin a vybrané metabolity. Kvercetin byl zvolen z několika důvodů: 1) je jedním z nejčastějších flavonoidů v potravě; 2) má již prokázané určité účinky (slabý inhibitor PKC) [320]; a zejména 3) existovaly informace o jeho rozdílných účincích po *per os* a *i.p.* podání [280], což odpovídalo naší hypotéze o vlivu kolonických metabolitů. Dále byly testovány isoflavony – zatím dokončeny glykosidy a příslušné aglykony, a silymarinové flavonolignany – parentní látky a jejich sulfatované konjugáty. Vzhledem k tomu, že látky jedné podskupiny jsou mnohdy metabolizovány obdobným způsobem za vzniku řady společných metabolitů, práce pokrývá metabolity širší skupiny patentních látek.

Vasoaktivita testovaných **glykosidů** *ex vivo* na aortě potkana byla jen velmi malá nebo žádná, proto jsme v jejich dalším zkoumání nepokračovali. **Aglykony** byly účinnější. Na potkaní aortě se hodnota EC_{50} pohybovala v nižších desítkách μM (flavonoly kvercetin, tamarixetin, isorhamnetin; isoflavony biochanin A, glycitein a genistein, flavonolignany silybin A a silychristin). Screening *ex vivo* jsme nedávno rozšířili o metodu izolované prasečí koronární cévy. Vzhledem k podobnosti mezi lidským a prasečím srdcem [295] předpokládáme, že tyto výsledky mají solidní výpovědní hodnotu. Ukázalo se, že vasoaktivita na tomto modelu může v některých případech překonat tu na potkaní aortě. Zatím jsme stihli otestovat skupinu parentních isoflavonů a hodnota EC_{50} např. pro biochanin A zde byla 5,5 μM oproti 25,4 μM na potkaní aortě.

Metabolity II. fáze (konjugáty) jsme dosud testovali pro kvercetin a pro flavonolignany silymarinu. Jejich aktivita byla buď zanedbatelná (kvercetin-3-*O*-glukuronid a část sulfátů flavonolignanů) nebo nejvýše srovnatelná s parentní látkou (ostatní konjugáty flavonolignanů). Výjimkou byl silychristin-19-*O*-sulfát s $EC_{50}=19 \mu\text{M}$. Jediný námi testovaný dikonjugát byl zcela neúčinný. Konjugáty v našich pokusech sice nebyly *ex vivo* účinnými vasodilatátory, ale nebylo by vhodné je z našich dalších úvah vylučovat. Některé jsou považovány za nosiče, které *in vivo* hydrolýzou uvolňují vasoaktivně účinnou látku. Konkrétně je v této souvislosti zmiňován kvercetin-3-*O*-glukuronid [280, 296]. V našich pokusech *ex vivo* to byla ale látka neúčinná a ani v pokusech *in vivo* se nám vasodilatační účinek nepodařilo prokázat (nepublikované výsledky). Biologický účinek by podle literatury snad mohly mít i konjugáty metabolitů, konkrétně pro 4-methylkatechol sulfát bylo zjištěno, že dokázal u potkanů *in vivo* zvrátit hypertrofii kardiomyocytů navozenou fenylefrinem [297].

Nejvíce biologicky reálné účinky jsme pozorovali u některých **malých kolonických metabolitů**. V souladu s úvodní hypotézou několik z nich navodilo vasodilataci *ex vivo* a účinností překonalo parentní látky i jejich konjugáty. Vasoaktivita byla následně potvrzena *in vivo*. Pořadí v účinnosti se překvapivě lišilo. *Ex vivo* byla nejúčinnější kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, *in vivo* kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová. Tento zdánlivý rozpor se podařilo vysvětlit při následujících pokusech *ex vivo* s malými rezistentními arteriemi, které jsou pro krevní tlak rozhodující. Látky s vyšším účinkem na malé cévy *ex vivo* měly i vyšší účinek na krevní tlak *in vivo*. Je známo, že u dilatace malých rezistentních cév roste role membránových kanálů K_{ir} a vasodilatace nezávislá na NO za účasti kanálů IK_{Ca} . Právě tyto mechanismy jsou na základě mechanistických studií možné u *in vivo* nejúčinnější látky, kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové.

Doba trvání antihypertenzního účinku

Překvapením, které odporovalo naší hypotéze, bylo krátké trvání antihypertenzního účinku **jednotlivých kolonických metabolitů** jak po bolusovém, tak po infusním *in vivo* podání. To nicméně nemusí odpovídat skutečnosti, protože tyto látky v reálné situaci nepůsobí samostatně. Abychom napodobili kontinuální vstřebávání směsi metabolitů z trávicího traktu, vyzkoušeli jsme infuzní podání několika různých dvojkombinací zkoumaných látek. Protože při individuálním *in vivo* podání kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová v účinku trochu zaostávala za dalšími dvěma metabolity, logicky jsme dávali větší naději do společného podání kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové a 4-methylkatecholu. Překvapivě to byla dvojkombinace kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové a 4-methylkatecholu, která jako jediná vedla

k prodloužení účinku na celou dobu infuze a pokles krevního tlaku přetrvával i po jejím ukončení. Vysvětlením by mohl být rozdílný mechanismus účinku, kdy se zkombinovalo působení na endotelu zcela závislé a zcela nezávislé. Je možné, že mezi účinky dalších dvou kombinací látek je určitý překryv, a proto jsme v těchto případech nenalezli synergistické působení. Z daného se dá tedy předpokládat, že pro vasoaktivitu polyfenolů je důležitá právě tato souhra účinků více látek včetně kolonických metabolitů. Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová byla v dvojkombinacích o něco méně účinná, nicméně je nutné si uvědomit, že (1) je často považována za dominantní humánní metabolit různých kvercetinových glykosidů [272, 298-300], a (2) vykazuje širší spektrum příznivých biologických účinků – např. inhibuje sekreci prozánětlivých cytokinů v mononukleárech [301], *in vitro* vychytává volné radikály a snižuje toxicitu navozenou H₂O₂ [302]. Svým reálným významem tak může předčít jiné metabolity. V její prospěch mluví i to, že je součástí fyziologického metabolismu. Přetrvávající účinek po ukončení infuze nastolil také otázku možného přesunu látek do vaskulární tkáně. U kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové a u 4-metylkatecholu dvojkompartimentová analýza skutečně prokázala rychlou distribuci [303]. Nyní obdobným způsobem zkusíme *in vivo* trojkombinace látek (dosud nepublikováno).

Koncentrace v plazmě

Pro využití základního výzkumu je důležitý nejen farmakologický účinek látky, ale také reálná dosažitelnost potřebné koncentrace v plazmě. **Glykosidy** i **aglykony** polyfenolů mají obecně malou biodostupnost, např. biodostupnost glykosidu rutinu a jeho aglykonu kvercetin je odhadována na pouze 0,3-1,4 %. Podobně parentní silymarinové flavonolignany se dostávají do centrálního kompartmentu méně než z 1 % [304]. Při běžné dietě plazmatické koncentrace parentních látek většinou nepřesahují 1 μM [305-307]. Vyšších koncentrací je možné dosáhnout zvýšením příjmu nebo použitím nových lékových forem [308], zejména nanočástic. U silybinu byla takto navozena plazmatická koncentrace v desítkách μM [309]. S vyšším příjmem následně stoupá i tvorba metabolitů, mezi příjmem polyfenolů a hladinou metabolitů v plazmě je lineární vztah [310]. Z dostupných farmakokinetických údajů dále vyplývá, že většina polyfenolů z potravy dosahuje maximální plazmatické koncentrace během 1-2 hodin po požití. Výjimkou je např. rutin, kdy c_{max} pro jeho aglykon kvercetin je navozena asi po 9 hodinách [306]. Koncentrace v plazmě rychle klesají ($T_{1/2} \sim 1-2$ hodiny), čili udržení plazmatické hladiny vyžaduje opakovaný přísun polyfenolů z trávicího traktu. Plazmatické hladiny **konjugátů aglykonů** se většinou mění podobně jako u parentních látek. **Kolonické metabolity** vznikají během průchodu glykosidů a aglykonů tlustým střevem a postupně se vstřebávají [275]. Maximální plazmatická

koncentrace je navozena se zpožděním, např. po požití směsi polyfenolů činila u kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové asi 8 hodin [311]. Podobně hladina kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové v plazmě stále stoupala i za 6 hodin po konzumaci nápoje bohatého na polyfenoly [312]. Za vstřebáním fenolických kyselin pravděpodobně stojí transportéry pro monokarboxylové kyseliny MCT [313].

V našich pokusech *ex vivo* s potkaní aortou byla u neúčinnějšího **kolonického metabolitu**, kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové, hodnota **EC₅₀ pro vasodilataci v jednotkách μM**. V pokusech *in vivo* byla nejmenší dávka navozující signifikantní pokles krevního tlaku 0,5 mg.kg⁻¹ kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové. Odhad tímto navozené koncentrace v plazmě není snadný. Vzhledem k tomu, že ve farmakokinetické studii jsme u potkana po podání dávky 10 mg.kg⁻¹ kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové našli plazmatickou $c_{max}=19 \mu\text{g.ml}^{-1}$ [314], po aplikaci dávky 0,5 mg.kg⁻¹ mohla být dosažena c_{max} do 1 μg.ml⁻¹, což by odpovídalo nižším jednotkám μM. Obdobně můžeme účinnou koncentraci u potkana zhruba odhadnout u kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové a 4-methylkatecholu rovněž na jednotky μM. Aproximace našich výsledků u potkana na účinnou dávku u člověka je velmi obtížná, ale předpokládáme, že může být řádově podobná. Z dostupných humánní studií vyplývá, že dosažitelné hladiny námi studovaných tří metabolitů jsou stovky nM až nižší jednotky μM pro kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou [312, 315-317] a stovky nM pro kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou [311, 315, 317]. Pro 4-methylkatechol bohužel chybí informace, jediným dostupným údajem je hladina konjugátu 4-methylkatechol sulfátu, což byly nižší jednotky μM [310]. Ohledně koncentrace v humánní plazmě vyplývá ze stejných zdrojů ještě jeden zajímavý fakt a to, že některé kolonické metabolity mají v plazmě bazální hladinu navzdory svému krátkému poločasu [303, 314]. U kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové to je přibližně 100 nM [311], u kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové desítky nM [318]. To je v souladu s hypotézou kontinuálního přísunu metabolitů polyfenolů z potravy díky pozvolné metabolizaci. V případě kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové ale platí, že v těle vzniká i fyziologicky jako metabolit dopaminu [272], což zároveň implikuje existenci přirozeného způsobu metabolizace a nízkou toxicitu. Bazální hladinu má i konjugát 4-methylkatechol sulfát [319].

Nízkou biodostupnost kvercetinů jsme v jednom období zkusili obejít použitím jeho disperze s polyvinylpyrrolidonem. Rozpustnost kvercetinů se tak zvýšila asi dvacet tisíckrát a po *i.v.* aplikaci skutečně dokázal prolongovaně snížit krevní tlak. Zároveň se ukázalo, že *i.v.* podaný kvercetin se velmi rychle metabolizuje. Ve stejné době jsme také prokázali, že za účinkem polyfenolů stojí alespoň částečně metabolity. Ve snaze o zvýšení biodostupnosti

jsme proto již nepokračovali. V dalších pokusech jsme se věnovali metabolitům, což spojuje dvě velké výhody – účinnost a obvykle dobrou rozpustnost ve vodě.

Interindividuální variabilita v tvorbě metabolitů

V působení polyfenolických látek na kardiovaskulární systém a KVO hraje roli velká interindividuální variabilita. Ta se týká i tvorby účinných metabolitů mikrobiomem. Kolonický mikrobiom představuje komplex až třiceti šesti tisíc druhů bakterií [320], schopnost metabolizace polyfenolů mají jen některé z nich. Mezi jedinci jsou velké rozdíly a rozdílné je i spektrum vzniklých metabolitů. Nicméně za hlavní metabolity **kvercetinu** a jeho glykosidů jsou u člověka i u potkana považovány kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctová a 3-hydroxyfenyloctová [272], což byly látky účinné v našich experimentech. U **isoflavonů** je v tomto ohledu situace složitější. Zatímco metabolit *O*-desmethylangolensin vytváří 80-90 % lidské populace, jiný metabolit, equol, již jen 30-50 % [272, 276, 321]. O interindividuální variabilitě v metabolismu **silymarinů** je málo informací, ale zdá se, že bude značná [322]. V souvislosti s mikrobiomem je třeba brát také v potaz, že vliv je vzájemný a dochází např. k ovlivnění membránových transportérů pro karboxylové kyseliny [323]. Význam vlivu přírodních polyfenolů na mikrobiom stoupá s dlouhodobým opakovaným příjmem. V našich pokusech *in vivo* jsme obešli vliv metabolizace a absorpce tím, že jsme testované látky včetně metabolitů podávali intravenózně. Bylo by zajímavé rozšířit naši práci o dlouhodobější pokusy *s per os* podáním přírodních polyfenolů.

8. Shrnutí, probíhající práce a možné směry do budoucna

Prezentované práce rozšiřují naše poznatky o příznivých kardiovaskulárních účincích přírodních polyfenolů, zejména se snaží podhalit zodpovědné látky a jejich mechanismy účinku. Pokud je nám známo, tak v roce 2016 jsme jako první prokázali, že malé kolonické metabolity vzniklé vlivem střevní mikroflóry mohou mít hemodynamické účinky [314] a že tyto účinky mohou nastat v klinicky dosažitelných koncentracích. Ty se sice nemohou měřit s účinnými koncentracemi zavedených léčiv (hodnoty EC_{50} *ex vivo* neúčinnějších látek jsou v jednotkách až nižších desítkách μM , zatímco např. u kalciového blokátoru nifedipinu to je 4,47 nM [324]), nicméně je třeba mít na paměti, že se nejedná o léčiva, nýbrž o látky přijímané v rámci diety anebo jako doplňky stravy.

I přes tyto námitky o atraktivnosti přírodních polyfenolů svědčí:

- **rostoucí výzkum** jejich biologických účinků a hledání potenciálních indikací. Původní vnímání polyfenolů jako antioxidantů se posunulo a dnes jsou chápány jako látky s komplexním působením na lidský organismus [270]
- vývoj **nových lékových forem** včetně nanočástic s cílem zvýšit biodostupnost [308, 325]
- **zkoumání mechanismu účinku**, kde je stále větší důraz kladen na **metabolity**. U mikrobiálních metabolitů flavonoidů již byly prokázány např. účinky antioxidační, protizánětlivé, antidiabetické, neuroprotektivní, proti rakovině tlustého střeva [276] a v přímém vztahu ke kardiovaskulárnímu systému inhibice angiotenzin konvertujícího enzymu [326] a antitrombotické účinky [284]. Podobně byly kardiovaskulární účinky popsány u metabolitů isoflavonů, např. protideštičkové [327] anebo vliv na hladinu LDL cholesterolu a poruchu vaskulární poddajnosti u equolu [328]
- ověřování **interakcí se známými léčivy** jak v základním výzkumu (kvercetin u potkanů zesílil protektivní účinky losartanu při kardiotoxicitě [329]), tak v humánních studiích (silymarin v kombinaci s atenololem a furosemidem prohloubil pokles tlaku krve, zlepšil lipidový profil a redukoval mikroalbuminurii [330])

Naše výsledky potvrzují **příznivé kardiovaskulární účinky** přírodních polyfenolických látek. Antihypertenzní působení je pravděpodobně zprostředkované **vasodilací** ve velkých odporových i v malých rezistentních arteriích. Parentní glykosidy jsou téměř neúčinné a nepřesvědčivě vyzněla i většina testovaných konjugátů. Účinek jsme naopak prokázali u některých aglykonů, např. kvercetinu, silybinu A, biochaninu A, a zejména u některých malých kolonických metabolitů. Mechanismus vasodilatačního účinku byl u různých látek jednoznačně odlišný. Našli jsme působení jak výlučně na endotel, tak výlučně na hladký cévní sval i jejich kombinaci. Rozmanitost účinků se zdá být výhodná, protože umožňuje zásah na více místech vasodilatační kaskády, jak se ukázalo při testování dvojkombinací látek. Testování *in vivo* proběhlo bolusovým podáním a *i.v.* infuzí. Ta se nejvíce blíží reálné situaci, protože kolonické metabolity se do centrálního kompartmentu dostávají postupně a jejich farmakokinetika nejvíce připomíná právě pomalou *i.v.* infuzi. Za důležitý výsledek pro další práci považujeme, že dlouhodobý pokles krevního tlaku se nám podařilo navodit pouze pomocí infuze kombinací látek.

Nyní plánujeme pokračovat jak v *ex vivo* screeningu vasodilatačních látek na bázi přírodních polyfenolů, tak v ověřování jejich účinků *in vivo* a v mechanistických studiích:

- v rámci **ex vivo screeningu** jsme nedávno dokončili pokusy s metabolity isoflavonů, jako nejvíce účinné se ukázaly equol a *O*-desmethylangolensin. V tuto chvíli probíhá

zpracování výsledků a příprava publikace. Nyní chceme rozšířit skupinu kolonických metabolitů kvercetinů o jejich konjugáty. Použijeme jak model potkaní aorty, tak prasečí koronární cévy. Prvním testovaným bude 4-methylkatechol sulfát. Dále do budoucna jsou obdobně v plánu konjugáty isoflavonů a jejich metabolitů. U silymarinu chceme screening doplnit o další konjugáty, glukuronidy. S testováním jejich malých metabolitů zatím nepočítáme, protože není známo, že by silymariny měly malé kolonické metabolity. Z dostupných informací také vyplývá, že jejich metabolismus I.fáze je marginální a ani v *in vitro* podmínkách nepřekračuje 1-2 % substrátu [331].

- V ***in vivo* pokusech** již začalo testování účinných metabolitů isoflavonů. U prvního z nich, *O*-desmethylangolensinu, podaného jako bolus jsme našli antihypertenzní účinek v dávce 2,5 mg.kg⁻¹. V dohledné době rozšíříme práci o další účinný metabolit, equol, a také o kyselinu 3-hydroxyfenyloctovou ze skupiny metabolitů flavonolů. Vždy vyzkoušíme podání bolusově, pomalou *i.v.* infuzí a různé kombinace s jinými účinnými metabolity. Pokud ve screeningu nalezneme další účinný vasodilatátor, i ten bude následně testován *in vivo*.
- V **mechanistických studiích** nyní vyhodnocujeme výsledky pro *O*-desmethylangolensin pro chystanou publikaci. Testujeme mechanismus vasodilatace kyselinou 3-hydroxyfenyloctovou zatím na aortě potkana, následně proběhnou obdobné pokusy na prasečí koronární cévě. Další látky budou testovány na mechanismus podle úspěšnosti ve screeningu a *in vivo* testech. Pro hlubší poznání mechanismu vasodilatačního účinku chceme rozšířit škálu testů. Na modelu prasečí koronární cévy jsme nedávno zavedli nové mechanistické pokusy s inhibicí adenylátcyklázy a solubilní guanylátcyklázy, které nyní plánujeme zavést i na potkaní aortě. Zcela nově chceme na obou modelech vyzkoušet pokusy s aktivátorem proteinkinázy C, bryostatinem.
- Je zřejmé, že příznivé účinky přírodních polyfenolů a jejich metabolitů na KVO vycházejí spíše z dlouhodobého působení než z akutního. Zde prezentované práce sledovaly akutní účinky na hemodynamiku. Přínosné by bylo rozšíření naší práce o **dlouhodobější studie**. Ty by lépe odrážely opakovaný příjem polyfenolů potravou anebo formou potravinových doplňků. Zároveň by mohl proběhnout reciproční vliv polyfenolů na mikrobiom, který v reálné situaci nepochybně existuje [277]. K těmto pokusům by bylo možné využít např. neinvazivního měření krevního tlaku, které máme k dispozici. Asi nejpřesvědčivější výsledky by přinesly telemetrické pokusy, o nákup příslušného vybavení nyní usilujeme.

Použitá literatura

1. Blausen.com staff, *Medical gallery of Blausen Medical 2014*. WikiJournal of Medicine 1 (2), 2014. [on line] Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Artery> [cit. 9.2.2021].
2. Cox, R.H. and N.J. Rusch, *New expression profiles of voltage-gated ion channels in arteries exposed to high blood pressure*. *Microcirculation*, 2002. **9**(4): p. 243-57.
3. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. *Cell*, 2007. **131**(6): p. 1047-58.
4. Bond, M., et al., *Release and recycling of calcium by the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig portal vein smooth muscle*. *J Physiol*, 1984. **355**: p. 677-95.
5. Liu, Z. and R.A. Khalil, *Evolving mechanisms of vascular smooth muscle contraction highlight key targets in vascular disease*. *Biochem Pharmacol*, 2018. **153**: p. 91-122.
6. VanBavel, E., et al., *Role of T-type calcium channels in myogenic tone of skeletal muscle resistance arteries*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. **283**(6): p. H2239-43.
7. Knot, H.J. and M.T. Nelson, *Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure*. *J Physiol*, 1998. **508 (Pt 1)**(Pt 1): p. 199-209.
8. Zholos, A., *Pharmacology of transient receptor potential melastatin channels in the vasculature*. *British journal of pharmacology*, 2010. **159**(8): p. 1559-1571.
9. Bergdahl, A., et al., *Plasticity of TRPC expression in arterial smooth muscle: correlation with store-operated Ca²⁺ entry*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. **288**(4): p. C872-80.
10. Earley, S. and J.E. Brayden, *Transient receptor potential channels in the vasculature*. *Physiol Rev*, 2015. **95**(2): p. 645-90.
11. Golovina, V.A., et al., *Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(2): p. H746-55.
12. Martinsen, A., C. Dessy, and N. Morel, *Regulation of calcium channels in smooth muscle: new insights into the role of myosin light chain kinase*. *Channels (Austin)*, 2014. **8**(5): p. 402-13.
13. Mori, M.X., et al., *Dynamics of receptor-operated Ca²⁺ currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P₂-PLC signaling pathway*. *Frontiers in Pharmacology*, 2015. **6**(22).
14. Roos, J., et al., *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function*. *J Cell Biol*, 2005. **169**(3): p. 435-45.
15. Harder, D.R., *Pressure-induced myogenic activation of cat cerebral arteries is dependent on intact endothelium*. *Circ Res*, 1987. **60**(1): p. 102-7.
16. Aguetz, E., et al., *Stretch-activated TRPV2 channels: Role in mediating cardiopathies*. *Prog Biophys Mol Biol*, 2017. **130**(Pt B): p. 273-280.
17. Welsh, D.G., et al., *Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries*. *Circ Res*, 2002. **90**(3): p. 248-50.
18. Dulhunty, A.F. and P. Pouliquin, *What we don't know about the structure of ryanodine receptor calcium release channels*. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 2003. **30**(10): p. 713-723.
19. Evans, A.M., *Nanojunctions of the Sarcoplasmic Reticulum Deliver Site- and Function-Specific Calcium Signaling in Vascular Smooth Muscles*. *Adv Pharmacol*, 2017. **78**: p. 1-47.
20. Harraz, O.F., et al., *CaV1.2/CaV3.x channels mediate divergent vasomotor responses in human cerebral arteries*. *J Gen Physiol*, 2015. **145**(5): p. 405-18.
21. Hamilton, S.L. and Serysheva, II, *Ryanodine receptor structure: progress and challenges*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(7): p. 4047-51.
22. Tykocki, N.R., E.M. Boerman, and W.F. Jackson, *Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles*. *Compr Physiol*, 2017. **7**(2): p. 485-581.
23. Hofmann, T., et al., *TRPM5 is a voltage-modulated and Ca²⁺-activated monovalent selective cation channel*. *Curr Biol*, 2003. **13**(13): p. 1153-8.
24. Launay, P., et al., *TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization*. *Cell*, 2002. **109**(3): p. 397-407.
25. Cox, R.H. and S. Petrou, *Ca²⁺ influx inhibits voltage-dependent and augments Ca²⁺-dependent K⁺ currents in arterial myocytes*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(1): p. C51-63.
26. Hill, M.A. and G.A. Meininger, *Small artery mechanobiology: Roles of cellular and non-cellular elements*. *Microcirculation*, 2016. **23**(8): p. 611-613.
27. Touyz, R.M., et al., *Vascular smooth muscle contraction in hypertension*. *Cardiovasc Res*, 2018. **114**(4): p. 529-539.
28. Rodrigo, G.C. and N.B. Standen, *ATP-sensitive potassium channels*. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(15): p. 1915-40.
29. Tu, H., Z. Wang, and I. Bezprozvanny, *Modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms by calcium: a role of calcium sensor region*. *Biophysical journal*, 2005. **88**(2): p. 1056-1069.
30. Fill, M. and J.A. Copello, *Ryanodine receptor calcium release channels*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(4): p. 893-922.
31. Toussaint, F., et al., *Vascular CaMKII: heart and brain in your arteries*. *American journal of physiology. Cell physiology*, 2016. **311**(3): p. C462-C478.

32. Prosser, B.L., et al., *S100A1 binds to the calmodulin-binding site of ryanodine receptor and modulates skeletal muscle excitation-contraction coupling*. J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 5046-57.
33. Treves, S., et al., *Interaction of S100A1 with the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle*. Biochemistry, 1997. **36**(38): p. 11496-503.
34. Jaggar, J.H., et al., *Ca²⁺ channels, ryanodine receptors and Ca(2+)-activated K⁺ channels: a functional unit for regulating arterial tone*. Acta Physiol Scand, 1998. **164**(4): p. 577-87.
35. Lee, N., et al., *Ca(2+) Regulation of Ca(v)3.3 T-type Ca(2+) Channel Is Mediated by Calmodulin*. Mol Pharmacol, 2017. **92**(3): p. 347-357.
36. Colyer, J., *Phosphorylation states of phospholamban*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **853**: p. 79-91.
37. Cartwright, E.J., et al., *Ca²⁺ signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps*. Sci China Life Sci, 2011. **54**(8): p. 691-8.
38. Blaustein, M.P. and J.M. Hamlyn, *Sodium transport inhibition, cell calcium, and hypertension. The natriuretic hormone/Na⁺-Ca²⁺ exchange/hypertension hypothesis*. Am J Med, 1984. **77**(4a): p. 45-59.
39. Finkel, T., et al., *The Ins and Outs of Mitochondrial Calcium*. Circulation Research, 2015. **116**(11): p. 1810-1819.
40. Grange, J.J., et al., *Protein kinase C isoforms in human aortic smooth muscle cells*. J Vasc Surg, 1998. **27**(5): p. 919-26; discussion 926-7.
41. Kikkawa, U., et al., *Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters*. J Biol Chem, 1983. **258**(19): p. 11442-5.
42. Mederos y Schnitzler, M., et al., *Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction*. Embo j, 2008. **27**(23): p. 3092-103.
43. Shish, D.F., D.G. Welsh, and J.E. Brayden, *Diacylglycerol and protein kinase C activate cation channels involved in myogenic tone*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(6): p. H2196-201.
44. Nalli, A.D., et al., *Regulation of Gβγi-dependent PLC-β3 activity in smooth muscle: inhibitory phosphorylation of PLC-β3 by PKA and PKG and stimulatory phosphorylation of Gai-GTPase-activating protein RGS2 by PKG*. Cell Biochem Biophys, 2014. **70**(2): p. 867-80.
45. Griendling, K.K., et al., *Sustained diacylglycerol formation from inositol phospholipids in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1986. **261**(13): p. 5901-6.
46. Dubois, T., et al., *Annexins and protein kinases C*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1313**(3): p. 290-4.
47. Ron, D. and M.G. Kazanietz, *New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors*. Faseb j, 1999. **13**(13): p. 1658-76.
48. Steinberg, S.F., *Structural basis of protein kinase C isoform function*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1341-78.
49. Gopalakrishna, R. and W.B. Anderson, *Ca²⁺- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidative modification of the regulatory domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(17): p. 6758-62.
50. Choi, H., R.C. Tostes, and R.C. Webb, *S-nitrosylation Inhibits protein kinase C-mediated contraction in mouse aorta*. J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **57**(1): p. 65-71.
51. Balafanova, Z., et al., *Nitric Oxide (NO) Induces Nitration of Protein Kinase Cε (PKCε), Facilitating PKCε Translocation via Enhanced PKCε-RACK2 Interactions*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**: p. 15021-15027.
52. Singh, S.S., et al., *Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. Biochemical and biophysical research communications, 1993. **195**(1): p. 104-112.
53. Saleh, S., et al., *Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes*. The Journal of physiology, 2007. **577**: p. 479-95.
54. Gong, M.C., et al., *Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium*. J Biol Chem, 1992. **267**(30): p. 21492-8.
55. Hui, D.Y., *Phospholipase A(2) enzymes in metabolic and cardiovascular diseases*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(3): p. 235-40.
56. Somlyo, A.V., et al., *Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(15): p. 5231-5.
57. Yamamoto, H. and C. van Breemen, *Inositol-1,4,5-trisphosphate releases calcium from skinned cultured smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **130**(1): p. 270-4.
58. Song, T., et al., *Inositol 1,4,5-trisphosphate activates TRPC3 channels to cause extracellular Ca²⁺ influx in airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **309**(12): p. L1455-66.
59. Walker, J.W., et al., *Kinetics of smooth and skeletal muscle activation by laser pulse photolysis of caged inositol 1,4,5-trisphosphate*. Nature, 1987. **327**(6119): p. 249-52.
60. Ringvold, H.C. and R.A. Khalil, *Protein Kinase C as Regulator of Vascular Smooth Muscle Function and Potential Target in Vascular Disorders*. Adv Pharmacol, 2017. **78**: p. 203-301.
61. Callaghan, B., S.D. Koh, and K.D. Keef, *Muscarinic M2 receptor stimulation of Cav1.2b requires phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and c-Src*. Circ Res, 2004. **94**(5): p. 626-33.
62. Ledoux, J., et al., *Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 69-78.

63. Minami, K., K. Fukuzawa, and Y. Nakaya, *Protein kinase C inhibits the Ca(2+)-activated K+ channel of cultured porcine coronary artery smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **190**(1): p. 263-9.
64. Taguchi, K., K. Kaneko, and T. Kubo, *Protein kinase C modulates Ca2+-activated K+ channels in cultured rat mesenteric artery smooth muscle cells*. *Biol Pharm Bull*, 2000. **23**(12): p. 1450-4.
65. Brueggemann, L.I., et al., *Differential protein kinase C-dependent modulation of Kv7.4 and Kv7.5 subunits of vascular Kv7 channels*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(4): p. 2099-111.
66. Novokhatska, T., et al., *Correction of vascular hypercontractility in spontaneously hypertensive rats using shRNAs-induced delta protein kinase C gene silencing*. *Eur J Pharmacol*, 2013. **718**(1-3): p. 401-7.
67. Renaud, J.M., et al., *Modulation of muscle contractility during fatigue and recovery by ATP sensitive potassium channel*. *Acta Physiol Scand*, 1996. **156**(3): p. 203-12.
68. Shi, W.-W., et al., *K(ATP) channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases*. *Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]*, 2012. **64**(1): p. 1-13.
69. Salamanca, D.A. and R.A. Khalil, *Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **70**(11): p. 1537-47.
70. Woodsome, T.P., et al., *Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca(2+) sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle*. *J Physiol*, 2001. **535**(Pt 2): p. 553-64.
71. Kim, H.R., et al., *Smooth muscle signalling pathways in health and disease*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(6a): p. 2165-80.
72. Yamaguchi, H., et al., *Altered PDGF-BB-induced p38 MAP kinase activation in diabetic vascular smooth muscle cells: roles of protein kinase C-delta*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(11): p. 2095-101.
73. Kim, H.R., C. Gallant, and K.G. Morgan, *Regulation of PKC autophosphorylation by calponin in contractile vascular smooth muscle tissue*. *BioMed research international*, 2013. **2013**: p. 358643-358643.
74. Je, H.D., et al., *Calponin is required for agonist-induced signal transduction--evidence from an antisense approach in ferret smooth muscle*. *J Physiol*, 2001. **537**(Pt 2): p. 567-77.
75. Kim, H.R., C. Gallant, and K.G. Morgan, *Regulation of PKC autophosphorylation by calponin in contractile vascular smooth muscle tissue*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 358643.
76. Bertorello, A.M., et al., *Phosphorylation of the catalytic subunit of Na+,K(+)-ATPase inhibits the activity of the enzyme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(24): p. 11359-62.
77. Austin, C. and S. Wray, *Interactions between Ca(2+) and H(+) and functional consequences in vascular smooth muscle*. *Circ Res*, 2000. **86**(3): p. 355-63.
78. Aviv, A., *Cytosolic Ca2+, Na+/H+ antiport, protein kinase C trio in essential hypertension*. *Am J Hypertens*, 1994. **7**(2): p. 205-12.
79. Wray, S. and R.D. Smith, *Mechanisms of action of pH-induced effects on vascular smooth muscle*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2004. **263**(1): p. 163-172.
80. Soma, S., et al., *Involvement of protein kinase C in the regulation of Na+/Ca2+ exchanger in bovine adrenal chromaffin cells*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009. **36**(7): p. 717-23.
81. Johnson, J.A. and S.A. Barman, *Protein kinase C modulation of cyclic GMP in rat neonatal pulmonary vascular smooth muscle*. *Lung*, 2004. **182**(2): p. 79-89.
82. Andrea, J.E. and M.P. Walsh, *Protein kinase C of smooth muscle*. *Hypertension*, 1992. **20**(5): p. 585-95.
83. Inagaki, M., et al., *Purified rabbit brain protein kinase C relaxes skinned vascular smooth muscle and phosphorylates myosin light chain*. *Arch Biochem Biophys*, 1987. **254**(1): p. 136-41.
84. Katada, T., et al., *Protein kinase C phosphorylates the inhibitory guanine-nucleotide-binding regulatory component and apparently suppresses its function in hormonal inhibition of adenylate cyclase*. *Eur J Biochem*, 1985. **151**(2): p. 431-7.
85. Partovian, C., et al., *PKCalpha activates eNOS and increases arterial blood flow in vivo*. *Circ Res*, 2005. **97**(5): p. 482-7.
86. Mendonça, M.C., N. Koles, and D.F. Sellitti, *Protein kinase C-δ (PKC-δ) and PKC-α mediate Ca(2+)-dependent increases in CNP mRNA in human vascular cells*. *Vascul Pharmacol*, 2012. **57**(2-4): p. 98-104.
87. Shi, J., et al., *Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells*. *J Physiol*, 2004. **561**(Pt 2): p. 415-32.
88. Mao, Y., et al., *Adrenomedullin and adrenotensin increase the transcription of regulator of G-protein signaling 2 in vascular smooth muscle cells via the cAMP-dependent and PKC pathways*. *Mol Med Rep*, 2014. **9**(1): p. 323-7.
89. Sheetz, M.J., et al., *Effect of ruboxistaurin (RBX) On visual acuity decline over a 6-year period with cessation and reinstatement of therapy: results of an open-label extension of the Protein Kinase C Diabetic Retinopathy Study 2 (PKC-DRS2)*. *Retina*, 2011. **31**(6): p. 1053-9.
90. Strati, P., et al., *Phase I/II trial of the combination of midostaurin (PKC412) and 5-azacytidine for patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*. *Am J Hematol*, 2015. **90**(4): p. 276-81.
91. Boscoboinik, D., et al., *Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(10): p. 6188-94.
92. Gopalakrishna, R. and S. Jaken, *Protein kinase C signaling and oxidative stress*. *Free Radic Biol Med*, 2000. **28**(9): p. 1349-61.

93. Liu, J.Y., S.J. Lin, and J.K. Lin, *Inhibitory effects of curcumin on protein kinase C activity induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in NIH 3T3 cells*. *Carcinogenesis*, 1993. **14**(5): p. 857-61.
94. Ward, N.E., et al., *Irreversible inactivation of protein kinase C by glutathione*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(20): p. 12558-66.
95. Newman, A.H., *A Novel PKC Inhibitor Shows Promise for Amphetamine Use Disorders*. *Neuropsychopharmacology*, 2017. **42**(10): p. 1929-1930.
96. Narumiya, S. and D. Thumkeo, *Rho signaling research: history, current status and future directions*. *FEBS Letters*, 2018. **592**(11): p. 1763-1776.
97. Hartmann, S., A. Ridley, and S. Lutz, *The Function of Rho-Associated Kinases ROCK1 and ROCK2 in the Pathogenesis of Cardiovascular Disease*. *Frontiers in Pharmacology*, 2015. **6**.
98. Bourmeyster, N. and P.V. Vignais, *Phosphorylation of Rho GDI stabilizes the Rho A-Rho GDI complex in neutrophil cytosol*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **218**(1): p. 54-60.
99. Araki, S., et al., *Arachidonic acid-induced Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase*. *Pflugers Arch*, 2001. **441**(5): p. 596-603.
100. Gong, M.C., et al., *Translocation of rhoA associated with Ca²⁺ sensitization of smooth muscle*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(16): p. 10704-9.
101. Mbikou, P., et al., *Contribution of Rho kinase to the early phase of the calcium-contraction coupling in airway smooth muscle*. *Experimental physiology*, 2011. **96**: p. 240-58.
102. Wang, Y., et al., *ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 2009. **104**(4): p. 531-40.
103. Kitazawa, T., et al., *Agonists trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light chain phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(14): p. 9897-900.
104. Luykenaar, K.D., et al., *Pyrimidine nucleotides suppress KDR currents and depolarize rat cerebral arteries by activating Rho kinase*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004. **286**(3): p. H1088-H1100.
105. Kaneko, T., et al., *Identification of calponin as a novel substrate of Rho-kinase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **273**(1): p. 110-6.
106. Ohashi, K., et al., *Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(5): p. 3577-82.
107. Sumi, T., K. Matsumoto, and T. Nakamura, *Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 670-6.
108. Matsui, T., et al., *Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association*. *J Cell Biol*, 1998. **140**(3): p. 647-57.
109. Dee, R.A., et al., *Druggable targets in the Rho pathway and their promise for therapeutic control of blood pressure*. *Pharmacol Ther*, 2019. **193**: p. 121-134.
110. Laufs, U. and J.K. Liao, *Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(37): p. 24266-71.
111. Huvneers, S., M.J. Daemen, and P.L. Hordijk, *Between Rho(k) and a hard place: the relation between vessel wall stiffness, endothelial contractility, and cardiovascular disease*. *Circ Res*, 2015. **116**(5): p. 895-908.
112. Zhou, N., et al., *Rho Kinase Regulates Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness Via Actin/SRF/Myocardin in Hypertension*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **44**(2): p. 701-715.
113. Ito, K., et al., *Effects of hydroxyfasudil administered to the nucleus tractus solitarius on blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive rats*. *Clin Exp Hypertens*, 2005. **27**(2-3): p. 269-77.
114. Ito, K., et al., *Rho/Rho-kinase pathway in brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system: possible involvement in neural mechanisms of hypertension*. *Circ Res*, 2003. **92**(12): p. 1337-43.
115. Loirand, G., *Rho Kinases in Health and Disease: From Basic Science to Translational Research*. *Pharmacol Rev*, 2015. **67**(4): p. 1074-95.
116. Cario-Toumaniantz, C., et al., *RhoA guanine exchange factor expression profile in arteries: evidence for a Rho kinase-dependent negative feedback in angiotensin II-dependent hypertension*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. **302**(9): p. C1394-404.
117. Hiley, E., R. McMullan, and S.J. Nurrish, *The Galpha12-RGS RhoGEF-RhoA signalling pathway regulates neurotransmitter release in C. elegans*. *Embo j*, 2006. **25**(24): p. 5884-95.
118. Yamaguchi, Y., et al., *Galpha(12) and galpha(13) inhibit Ca(2+)-dependent exocytosis through Rho/Rho-associated kinase-dependent pathway*. *J Neurochem*, 2000. **75**(2): p. 708-17.
119. Zhang, Y. and S. Wu, *Effects of fasudil on pulmonary hypertension in clinical practice*. *Pulm Pharmacol Ther*, 2017. **46**: p. 54-63.
120. Sawada, N. and J.K. Liao, *Rho/Rho-associated coiled-coil forming kinase pathway as therapeutic targets for statins in atherosclerosis*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(8): p. 1251-67.
121. Gold, M.G., *Swimming regulations for protein kinase A catalytic subunit*. *Biochem Soc Trans*, 2019. **47**(5): p. 1355-1366.

122. Samelson, B.K., et al., *A-kinase Anchoring Protein 79/150 Recruits Protein Kinase C to Phosphorylate Roundabout Receptors*. J Biol Chem, 2015. **290**(22): p. 14107-19.
123. Sonkusare, S.K., et al., *AKAP150-dependent cooperative TRPV4 channel gating is central to endothelium-dependent vasodilation and is disrupted in hypertension*. Sci Signal, 2014. **7**(333): p. ra66.
124. Lu, T.W., et al., *Two PKA R1 α holoenzyme states define ATP as an isoform-specific orthosteric inhibitor that competes with the allosteric activator, cAMP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(33): p. 16347-16356.
125. Knape, M.J., et al., *Divalent Metal Ions Mg²⁺ and Ca²⁺ Have Distinct Effects on Protein Kinase A Activity and Regulation*. ACS Chem Biol, 2015. **10**(10): p. 2303-15.
126. Lezoualc'h, F., et al., *Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease*. Circ Res, 2016. **118**(5): p. 881-97.
127. Mitchell, J.A. and N.S. Kirkby, *Eicosanoids, prostacyclin and cyclooxygenase in the cardiovascular system*. Br J Pharmacol, 2019. **176**(8): p. 1038-1050.
128. Syed, A.U., et al., *Tonic regulation of middle meningeal artery diameter by ATP-sensitive potassium channels*. J Cereb Blood Flow Metab, 2019. **39**(4): p. 670-679.
129. Conti, M.A. and R.S. Adelstein, *The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 1981. **256**(7): p. 3178-81.
130. Murthy, K.S., et al., *Inhibition of sustained smooth muscle contraction by PKA and PKG preferentially mediated by phosphorylation of RhoA*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(6): p. G1006-16.
131. Yu, X., et al., *G protein-coupled estrogen receptor 1 mediates relaxation of coronary arteries via cAMP/PKA-dependent activation of MLCP*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2014. **307**(4): p. E398-407.
132. Yang, J.X. and Y. Lin, *The action of PKA on smooth muscle myosin phosphorylation*. Life Sci, 2005. **77**(21): p. 2669-75.
133. Hofmann, F. and J.W. Wegener, *cGMP-dependent protein kinases (cGK)*. Methods Mol Biol, 2013. **1020**: p. 17-50.
134. Vaandrager, A.B., B.M. Hogema, and H.R. de Jonge, *Molecular properties and biological functions of cGMP-dependent protein kinase II*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 2150-64.
135. Kuhn, M., *Structure, regulation, and function of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors, with a focus on guanylyl cyclase-A*. Circ Res, 2003. **93**(8): p. 700-9.
136. Montfort, W.R., J.A. Wales, and A. Weichsel, *Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(3): p. 107-121.
137. VanSchouwen, B., et al., *Mechanism of cAMP Partial Agonism in Protein Kinase G (PKG)*. J Biol Chem, 2015. **290**(48): p. 28631-41.
138. Takahashi, S., et al., *Nitric oxide-cGMP-protein kinase G pathway negatively regulates vascular transient receptor potential channel TRPC6*. J Physiol, 2008. **586**(17): p. 4209-23.
139. Gudi, T., et al., *cGMP-dependent protein kinase inhibits serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and functions*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37382-93.
140. Geiselhöringer, A., et al., *IRAG is essential for relaxation of receptor-triggered smooth muscle contraction by cGMP kinase*. Embo j, 2004. **23**(21): p. 4222-31.
141. Schlossmann, J. and M. Desch, *IRAG and novel PKG targeting in the cardiovascular system*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(3): p. H672-82.
142. Tang, K.M., et al., *Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1506-12.
143. Kitazawa, T., et al., *Nitric oxide-induced biphasic mechanism of vascular relaxation via dephosphorylation of CPI-17 and MYPT1*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 14): p. 3587-603.
144. Mahavadi, S., et al., *Inhibition of MLC20 phosphorylation downstream of Ca²⁺ and RhoA: A novel mechanism involving phosphorylation of myosin phosphatase interacting protein (M-RIP) by PKG and stimulation of MLC phosphatase activity*. Cell Biochem Biophys, 2014. **68**(1): p. 1-8.
145. Sauzeau, V., et al., *RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9472-80.
146. Wilson, C., M.D. Lee, and J.G. McCarron, *Acetylcholine released by endothelial cells facilitates flow-mediated dilatation*. J Physiol, 2016. **594**(24): p. 7267-7307.
147. Khaddaj Mallat, R., et al., *The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2017. **54**(7-8): p. 458-470.
148. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update*. Acta Physiol (Oxf), 2017. **219**(1): p. 22-96.
149. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
150. Tsutsui, M., et al., *Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice*. J Pharmacol Sci, 2015. **127**(1): p. 42-52.
151. Rafikov, R., et al., *eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity*. J Endocrinol, 2011. **210**(3): p. 271-84.

152. Várnai, P., L. Hunyady, and T. Balla, *STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(3): p. 118-28.
153. Burnham, M.P., et al., *Characterization of an apamin-sensitive small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(5): p. 1133-43.
154. Sheng, J.Z., et al., *Openers of SKCa and IKCa channels enhance agonist-evoked endothelial nitric oxide synthesis and arteriolar vasodilation*. Faseb j, 2009. **23**(4): p. 1138-45.
155. Fredette, N.C., M.R. Meyer, and E.R. Prossnitz, *Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018. **176**: p. 65-72.
156. Miyazaki-Akita, A., et al., *17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase I by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(2): p. 591-8.
157. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
158. Chen, Z.P., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase*. FEBS Lett, 1999. **443**(3): p. 285-9.
159. Triggle, C.R., et al., *The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(6): p. 713-38.
160. García-Morales, V., M. Luaces-Regueira, and M. Campos-Toimil, *The cAMP effectors PKA and Epac activate endothelial NO synthase through PI3K/Akt pathway in human endothelial cells*. Biochem Pharmacol, 2017. **145**: p. 94-101.
161. Michell, B.J., et al., *Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 17625-8.
162. Chiu, J.J. and S. Chien, *Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 327-87.
163. Rodríguez, I. and M. González, *Physiological mechanisms of vascular response induced by shear stress and effect of exercise in systemic and placental circulation*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 209.
164. Bergaya, S., et al., *Flow-dependent dilation mediated by endogenous kinins requires angiotensin AT2 receptors*. Circ Res, 2004. **94**(12): p. 1623-9.
165. Mendoza, S.A., et al., *TRPV4-mediated endothelial Ca²⁺ influx and vasodilation in response to shear stress*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. **298**(2): p. H466-76.
166. Bagher, P., et al., *Low intravascular pressure activates endothelial cell TRPV4 channels, local Ca²⁺ events, and IKCa channels, reducing arteriolar tone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(44): p. 18174-9.
167. Takai, J., et al., *Laminar shear stress upregulates endothelial Ca²⁺-activated K⁺ channels KCa2.3 and KCa3.1 via a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase/Akt/p300 cascade*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(4): p. H484-93.
168. Evora, P.R., et al., *Nitric oxide and prostacyclin-dependent pathways involvement on in vitro induced hypothermia*. Cryobiology, 2007. **54**(1): p. 106-13.
169. Zheng, J., *Molecular mechanism of TRP channels*. Comprehensive Physiology, 2013. **3**(1): p. 221-242.
170. Zou, Q., S.W. Leung, and P.M. Vanhoutte, *Transient Receptor Potential Channel Opening Releases Endogenous Acetylcholine, which Contributes to Endothelium-Dependent Relaxation Induced by Mild Hypothermia in Spontaneously Hypertensive Rat but Not Wistar-Kyoto Rat Arteries*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **354**(2): p. 121-30.
171. Huang, Z., et al., *Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2099-107.
172. Castello, P.R., et al., *Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes*. Cell Metab, 2006. **3**(4): p. 277-87.
173. Kovacevic, I., et al., *The F-BAR Protein NOSTRIN Dictates the Localization of the Muscarinic M3 Receptor and Regulates Cardiovascular Function*. Circ Res, 2015. **117**(5): p. 460-9.
174. Adachi, T., et al., *S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide*. Nat Med, 2004. **10**(11): p. 1200-7.
175. Fukao, M., et al., *Sources of Ca²⁺ in relation to generation of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(7): p. 1328-34.
176. Chen, G.F. and H. Suzuki, *Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery*. J Physiol, 1990. **421**: p. 521-34.
177. Ellinworth, D.C., et al., *Endothelium-Derived Hyperpolarization and Coronary Vasodilation: Diverse and Integrated Roles of Epoxyeicosatrienoic Acids, Hydrogen Peroxide, and Gap Junctions*. Microcirculation, 2016. **23**(1): p. 15-32.
178. Chuaiphichai, S., et al., *Cell-autonomous role of endothelial GTP cyclohydrolase 1 and tetrahydrobiopterin in blood pressure regulation*. Hypertension, 2014. **64**(3): p. 530-40.
179. Martín-Garrido, A., et al., *H2O2 regulation of vascular function through sGC mRNA stabilization by HuR*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 567-73.

180. Bjelakovic, G., et al., *Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis*. *Jama*, 2007. **297**(8): p. 842-57.
181. Chu, L.Y., J.Y. Liou, and K.K. Wu, *Prostacyclin protects vascular integrity via PPAR/14-3-3 pathway*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2015. **118-119**: p. 19-27.
182. Fischer, D., et al., *Cytochrome P450 2C9 is involved in flow-dependent vasodilation of peripheral conduit arteries in healthy subjects and in patients with chronic heart failure*. *Eur J Heart Fail*, 2007. **9**(8): p. 770-5.
183. Nishikawa, Y., D.W. Stepp, and W.M. Chilian, *Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **279**(2): p. H459-65.
184. Widmann, M.D., et al., *Cytochrome P-450 pathway in acetylcholine-induced canine coronary microvascular vasodilation in vivo*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(1): p. H283-9.
185. Park, S.-K., et al., *GPR40 is a low-affinity epoxyeicosatrienoic acid receptor in vascular cells*. *The Journal of biological chemistry*, 2018. **293**(27): p. 10675-10691.
186. Watanabe, H., et al., *Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels*. *Nature*, 2003. **424**(6947): p. 434-8.
187. Sacks, D., et al., *Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke*. *Int J Stroke*, 2018. **13**(6): p. 612-632.
188. Jaggar, J.H., et al., *Heme is a carbon monoxide receptor for large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels*. *Circ Res*, 2005. **97**(8): p. 805-12.
189. Campbell, W.B. and I. Fleming, *Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses*. *Pflugers Arch*, 2010. **459**(6): p. 881-95.
190. Gauthier, K.M., et al., *Role of arachidonic acid lipoygenase metabolites in acetylcholine-induced relaxations of mouse arteries*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011. **300**(3): p. H725-35.
191. Ye, D., W. Zhou, and H.C. Lee, *Activation of rat mesenteric arterial KATP channels by 11,12-epoxyeicosatrienoic acid*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **288**(1): p. H358-64.
192. Ye, D., et al., *Mechanism of rat mesenteric arterial KATP channel activation by 14,15-epoxyeicosatrienoic acid*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. **290**(4): p. H1326-36.
193. Keserü, B., et al., *Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response*. *Faseb j*, 2008. **22**(12): p. 4306-15.
194. Campbell, W.B. and K.M. Gauthier, *Inducible endothelium-derived hyperpolarizing factor: role of the 15-lipoxygenase-EDHF pathway*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2013. **61**(3): p. 176-87.
195. Chauhan, S.D., et al., *Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(3): p. 1426-31.
196. Abbink, E.J., et al., *No role of calcium- and ATP-dependent potassium channels in insulin-induced vasodilation in humans in vivo*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2002. **18**(2): p. 143-8.
197. Zoccali, C., et al., *Paricalcitol and endothelial function in chronic kidney disease trial*. *Hypertension*, 2014. **64**(5): p. 1005-11.
198. Omae, T., et al., *Adiponectin-induced dilation of isolated porcine retinal arterioles via production of nitric oxide from endothelial cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013. **54**(7): p. 4586-94.
199. Hügel, H.M., et al., *Polyphenol protection and treatment of hypertension*. *Phytomedicine*, 2016. **23**(2): p. 220-31.
200. Oak, M.H., et al., *Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium*. *Free Radic Biol Med*, 2018. **122**: p. 161-170.
201. Migkos, T., et al., *Biochanin A, the Most Potent of 16 Isoflavones, Induces Relaxation of the Coronary Artery Through the Calcium Channel and cGMP-dependent Pathway*. *Planta Med*, 2020. **86**(10): p. 708-716.
202. Leung, F.P., et al., *Therapeutic concentrations of raloxifene augment nitric oxide-dependent coronary artery dilatation in vitro*. *Br J Pharmacol*, 2007. **152**(2): p. 223-9.
203. Torregrosa, G., et al., *Pharmacological profile of phytoestrogens in cerebral vessels: in vitro study with rabbit basilar artery*. *Eur J Pharmacol*, 2003. **482**(1-3): p. 227-34.
204. Wong, C.M., et al., *Raloxifene prevents endothelial dysfunction in aging ovariectomized female rats*. *Vascul Pharmacol*, 2006. **44**(5): p. 290-8.
205. Dantas, A.P., et al., *Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats*. *Hypertension*, 1999. **34**(4 Pt 2): p. 914-9.
206. Ospina, J.A., S.P. Duckles, and D.N. Krause, *17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(1): p. H241-50.
207. Katusic, Z.S., J.T. Shepherd, and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-dependent contraction to stretch in canine basilar arteries*. *Am J Physiol*, 1987. **252**(3 Pt 2): p. H671-3.
208. Jufri, N.F., et al., *Mechanical stretch: physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells*. *Vasc Cell*, 2015. **7**: p. 8.
209. Gao, Y., et al., *Hypoxic Vasospasm Mediated by cIMP: When Soluble Guanylyl Cyclase Turns Bad*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2015. **65**(6): p. 545-8.

210. Chen, Z., et al., *cIMP synthesized by sGC as a mediator of hypoxic contraction of coronary arteries*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **307**(3): p. H328-36.
211. Boedtkjer, E., et al., *Disruption of Na⁺,HCO₃⁻ cotransporter NBCn1 (slc4a7) inhibits NO-mediated vasorelaxation, smooth muscle Ca²⁺ sensitivity, and hypertension development in mice*. Circulation, 2011. **124**(17): p. 1819-29.
212. Thorin, E. and D.J. Webb, *Endothelium-derived endothelin-1*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 951-8.
213. Thorin, E. and M. Clozel, *The cardiovascular physiology and pharmacology of endothelin-1*. Adv Pharmacol, 2010. **60**: p. 1-26.
214. Liljesthl, I.K., K.B. Helle, and S. Aardal, *Relaxing effects of cyclic GMP and cyclic AMP-enhancing agents on the long-lasting contraction to endothelin-1 in the porcine coronary artery*. Scand J Clin Lab Invest, 1998. **58**(8): p. 625-34.
215. Meens, M.J., et al., *G-protein β subunits in vasorelaxing and anti-endothelinergic effects of calcitonin gene-related peptide*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(1): p. 297-308.
216. Kawasaki, H., et al., *Paracrine control of mesenteric perivascular axo-axonal interaction*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **203**(1): p. 3-11.
217. Rakugi, H., et al., *Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **169**(3): p. 973-7.
218. Mather, K.J., et al., *Endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(12): p. 3517-23.
219. Laffin, L.J. and G.L. Bakris, *Endothelin antagonism and hypertension: an evolving target*. Semin Nephrol, 2015. **35**(2): p. 168-75.
220. Sandoval, Y.H., et al., *Endothelin-1 signaling in vascular physiology and pathophysiology*. Curr Vasc Pharmacol, 2014. **12**(2): p. 202-14.
221. Goddard, J. and D.J. Webb, *Plasma endothelin concentrations in hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(4 Suppl 2): p. S25-31.
222. Kolettis, T.M., et al., *Endothelin in coronary artery disease and myocardial infarction*. Cardiol Rev, 2013. **21**(5): p. 249-56.
223. Viridis, A., et al., *Endothelial dysfunction in small arteries of essential hypertensive patients: role of cyclooxygenase-2 in oxidative stress generation*. Hypertension, 2013. **62**(2): p. 337-44.
224. Yang, D., et al., *A diffusible substance(s) mediates endothelium-dependent contractions in the aorta of SHR*. Hypertension, 2003. **41**(1): p. 143-8.
225. Topper, J.N., et al., *Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10417-22.
226. Gluais, P., et al., *In SHR aorta, calcium ionophore A-23187 releases prostacyclin and thromboxane A2 as endothelium-derived contracting factors*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(5): p. H2255-64.
227. Tian, X.Y., et al., *Oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2-derived prostaglandin f(2 α) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats*. Antioxid Redox Signal, 2012. **16**(4): p. 363-73.
228. Wong, S.L., et al., *Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F2 α mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging*. Circ Res, 2009. **104**(2): p. 228-35.
229. Moreno, J.J., *Eicosanoid receptors: Targets for the treatment of disrupted intestinal epithelial homeostasis*. Eur J Pharmacol, 2017. **796**: p. 7-19.
230. Hoopes, S.L., et al., *Vascular actions of 20-HETE*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2015. **120**: p. 9-16.
231. Li, X., et al., *20-Hydroxyeicosatetraenoic acid impairs endothelial insulin signaling by inducing phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 at Ser616*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95841.
232. Fuloria, M., et al., *20-hydroxyeicosatetraenoic acid is a vasoconstrictor in the newborn piglet pulmonary microcirculation*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(2): p. L360-5.
233. Liang, C.F., et al., *Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(4): p. 777-84.
234. Gluais, P., et al., *Acetylcholine-induced endothelium-dependent contractions in the SHR aorta: the Janus face of prostacyclin*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(6): p. 834-45.
235. Shi, Y. and P.M. Vanhoutte, *Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(3): p. 639-51.
236. Tang, E.H., et al., *Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium-derived contracting factor*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(1): p. 15-23.
237. Wang, D., et al., *Endothelial dysfunction and enhanced contractility in microvessels from ovariectomized rats: roles of oxidative stress and perivascular adipose tissue*. Hypertension, 2014. **63**(5): p. 1063-9.
238. Gollasch, M., *Vasodilator signals from perivascular adipose tissue*. Br J Pharmacol, 2012. **165**(3): p. 633-42.
239. Wong, M.S., et al., *Vitamin D derivatives acutely reduce endothelium-dependent contractions in the aorta of the spontaneously hypertensive rat*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(1): p. H289-96.
240. Wong, M.S. and P.M. Vanhoutte, *COX-mediated endothelium-dependent contractions: from the past to recent discoveries*. Acta Pharmacol Sin, 2010. **31**(9): p. 1095-102.

241. Ko, E.A., et al., *Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells*. J Smooth Muscle Res, 2008. **44**(2): p. 65-81.
242. Nieves-Cintrón, M., et al., *Regulation of voltage-gated potassium channels in vascular smooth muscle during hypertension and metabolic disorders*. Microcirculation, 2018. **25**(1).
243. Sadanaga, T., et al., *Decreased 4-aminopyridine sensitive K⁺ currents in endothelial cells from hypertensive rats*. Hypertens Res, 2002. **25**(4): p. 589-96.
244. Haddy, F.J., P.M. Vanhoutte, and M. Feletou, *Role of potassium in regulating blood flow and blood pressure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **290**(3): p. R546-52.
245. Ahn, S.J., et al., *Inwardly rectifying K⁺ channels are major contributors to flow-induced vasodilatation in resistance arteries*. J Physiol, 2017. **595**(7): p. 2339-2364.
246. Goto, K., et al., *Attenuation of conducted vasodilatation in rat mesenteric arteries during hypertension: role of inwardly rectifying potassium channels*. J Physiol, 2004. **561**(Pt 1): p. 215-31.
247. Kitazono, T., D.D. Heistad, and F.M. Faraci, *ATP-sensitive potassium channels in the basilar artery during chronic hypertension*. Hypertension, 1993. **22**(5): p. 677-81.
248. Spassova, M.A., et al., *A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16586-91.
249. Liu, D., et al., *Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats*. Hypertension, 2009. **53**(1): p. 70-6.
250. Peppiatt-Wildman, C.M., et al., *Endothelin-1 activates a Ca²⁺-permeable cation channel with TRPC3 and TRPC7 properties in rabbit coronary artery myocytes*. J Physiol, 2007. **580**(Pt.3): p. 755-64.
251. Earley, S., et al., *TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **297**(3): p. H1096-102.
252. Kwan, H.Y., et al., *TRPC1 associates with BK(Ca) channel to form a signal complex in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2009. **104**(5): p. 670-8.
253. Gao, F., et al., *Salt intake augments hypotensive effects of transient receptor potential vanilloid 4: functional significance and implication*. Hypertension, 2009. **53**(2): p. 228-35.
254. Large, W.A. and Q. Wang, *Characteristics and physiological role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ conductance in smooth muscle*. Am J Physiol, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C435-54.
255. Kong, B.W., et al., *Reduced activity of SKC a and Na-K ATPase underlies the accelerated impairment of EDH-type relaxations in mesenteric arteries of aging spontaneously hypertensive rats*. Pharmacol Res Perspect, 2015. **3**(3): p. e00150.
256. Weston, A.H., et al., *Impairment of endothelial SK(Ca) channels and of downstream hyperpolarizing pathways in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(4): p. 836-43.
257. Giachini, F.R., et al., *Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Transl Res, 2009. **154**(4): p. 183-93.
258. Sandow, S.L., et al., *Spatial separation of endothelial small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (K(Ca)) and connexins: possible relationship to vasodilator function?* J Anat, 2006. **209**(5): p. 689-98.
259. McNeish, A.J., et al., *Evidence for involvement of both IKCa and SKCa channels in hyperpolarizing responses of the rat middle cerebral artery*. Stroke, 2006. **37**(5): p. 1277-82.
260. Seki, T., et al., *Downregulation of Endothelial Transient Receptor Potential Vanilloid Type 4 Channel and Small-Conductance of Ca²⁺-Activated K⁺ Channels Underpins Impaired Endothelium-Dependent Hyperpolarization in Hypertension*. Hypertension, 2017. **69**(1): p. 143-153.
261. Fan, G., et al., *Elementary calcium signaling in arterial smooth muscle*. Channels (Austin), 2019. **13**(1): p. 505-519.
262. Schleifenbaum, J., et al., *Stretch-activation of angiotensin II type 1a receptors contributes to the myogenic response of mouse mesenteric and renal arteries*. Circ Res, 2014. **115**(2): p. 263-72.
263. Arnaudeau, S., N. Macrez-Leprêtre, and J. Mironneau, *Activation of calcium sparks by angiotensin II in vascular myocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **222**(3): p. 809-15.
264. Löhn, M., et al., *Ignition of calcium sparks in arterial and cardiac muscle through caveolae*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 1034-9.
265. Rovetti, R., et al., *Spark-induced sparks as a mechanism of intracellular calcium alternans in cardiac myocytes*. Circ Res, 2010. **106**(10): p. 1582-91.
266. Westcott, E.B. and W.F. Jackson, *Heterogeneous function of ryanodine receptors, but not IP3 receptors, in hamster cremaster muscle feed arteries and arterioles*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(5): p. H1616-30.
267. Saeed, Y., et al., *Structural and functional remodeling of the atrioventricular node with aging in rats: The role of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated and ryanodine 2 channels*. Heart Rhythm, 2018. **15**(5): p. 752-760.
268. Vanhoutte, P.M., *Serotonin and the vascular wall*. Int J Cardiol, 1987. **14**(2): p. 189-203.

269. Bansilal, S., J.M. Castellano, and V. Fuster, *Global burden of CVD: focus on secondary prevention of cardiovascular disease*. *Int J Cardiol*, 2015. **201 Suppl 1**: p. S1-7.
270. Del Bo, C., et al., *Systematic Review on Polyphenol Intake and Health Outcomes: Is there Sufficient Evidence to Define a Health-Promoting Polyphenol-Rich Dietary Pattern?* *Nutrients*, 2019. **11**(6).
271. Queen, B.L. and T.O. Tollefsbol, *Polyphenols and aging*. *Current aging science*, 2010. **3**(1): p. 34-42.
272. Murota, K., Y. Nakamura, and M. Uehara, *Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018. **82**(4): p. 600-610.
273. Liu, X.M., et al., *Dietary total flavonoids intake and risk of mortality from all causes and cardiovascular disease in the general population: A systematic review and meta-analysis of cohort studies*. *Mol Nutr Food Res*, 2017. **61**(6).
274. Pons, Z., et al., *Acute administration of single oral dose of grape seed polyphenols restores blood pressure in a rat model of metabolic syndrome: role of nitric oxide and prostacyclin*. *Eur J Nutr*, 2016. **55**(2): p. 749-758.
275. Williamson, G. and M.N. Clifford, *Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols*. *Biochem Pharmacol*, 2017. **139**: p. 24-39.
276. Feng, X., et al., *Insights into the intestinal bacterial metabolism of flavonoids and the bioactivities of their microbe-derived ring cleavage metabolites*. *Drug Metab Rev*, 2018. **50**(3): p. 343-356.
277. Cassidy, A. and A.M. Minihane, *The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids*. *Am J Clin Nutr*, 2017. **105**(1): p. 10-22.
278. Setchell, K.D. and C. Clerici, *Equol: history, chemistry, and formation*. *J Nutr*, 2010. **140**(7): p. 1355s-62s.
279. Atkinson, C., C.L. Frankenfeld, and J.W. Lampe, *Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2005. **230**(3): p. 155-70.
280. Galindo, P., et al., *Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats*. *Food Funct*, 2012. **3**(6): p. 643-50.
281. Garland, C.J. and K.A. Dora, *EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2017. **219**(1): p. 152-161.
282. Park, W.S., et al., *Increased inhibition of inward rectifier K⁺ channels by angiotensin II in small-diameter coronary artery of isoproterenol-induced hypertrophied model*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(8): p. 1768-75.
283. Winstead, M.V., J. Balsinde, and E.A. Dennis, *Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1488**(1-2): p. 28-39.
284. Applová, L., et al., *4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects*. *Mol Nutr Food Res*, 2019. **63**(20): p. e1900261.
285. Gencel, V.B., et al., *Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease*. *Mini Rev Med Chem*, 2012. **12**(2): p. 149-74.
286. Pase, M.P., N.A. Grima, and J. Sarris, *The effects of dietary and nutrient interventions on arterial stiffness: a systematic review*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(2): p. 446-54.
287. Sagara, M., et al., *Effects of dietary intake of soy protein and isoflavones on cardiovascular disease risk factors in high risk, middle-aged men in Scotland*. *J Am Coll Nutr*, 2004. **23**(1): p. 85-91.
288. Vahabzadeh, M., N. Amiri, and G. Karimi, *Effects of silymarin on metabolic syndrome: a review*. *J Sci Food Agric*, 2018. **98**(13): p. 4816-4823.
289. Parmenter, B.H., et al., *An overview and update on the epidemiology of flavonoid intake and cardiovascular disease risk*. *Food Funct*, 2020. **11**(8): p. 6777-6806.
290. Menezes, R., et al., *Impact of Flavonols on Cardiometabolic Biomarkers: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Human Trials to Explore the Role of Inter-Individual Variability*. *Nutrients*, 2017. **9**(2): p. 117.
291. Frei, B. and J.V. Higdon, *Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies*. *J Nutr*, 2003. **133**(10): p. 3275s-84s.
292. Khurana, S., et al., *Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging*. *Nutrients*, 2013. **5**(10): p. 3779-827.
293. Schini-Kerth, V.B., et al., *Vascular protection by natural product-derived polyphenols: in vitro and in vivo evidence*. *Planta Med*, 2011. **77**(11): p. 1161-7.
294. Najmanová, I., et al., *The pharmacokinetics of flavanones*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020. **60**(18): p. 3155-3171.
295. Lelovas, P.P., N.G. Kostomitsopoulos, and T.T. Xanthos, *A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2014. **53**(5): p. 432-8.
296. Menendez, C., et al., *Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed?* *Mol Nutr Food Res*, 2011. **55**(12): p. 1780-90.
297. Oudot, C., et al., *CSRP3 mediates polyphenols-induced cardioprotection in hypertension*. *J Nutr Biochem*, 2019. **66**: p. 29-42.
298. Appeldoorn, M.M., et al., *Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites*. *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(3): p. 1084-92.

299. Aura, A.M., et al., *Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(6): p. 1725-30.
300. Yang, J., et al., *Identification of the major metabolites of hyperoside produced by the human intestinal bacteria using the ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. J Ethnopharmacol, 2013. **147**(1): p. 174-9.
301. Monagas, M., et al., *Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells*. Br J Nutr, 2009. **102**(2): p. 201-6.
302. Tang, Y., et al., *3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides*. Food Res Int, 2016. **89**(Pt 1): p. 716-723.
303. Pourová, J., et al., *Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo*. Vascul Pharmacol, 2018. **111**: p. 36-43.
304. Calani, L., et al., *Absorption and metabolism of milk thistle flavanolinans in humans*. Phytomedicine, 2012. **20**(1): p. 40-6.
305. Cassidy, A., S. Bingham, and K.D. Setchell, *Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women*. Am J Clin Nutr, 1994. **60**(3): p. 333-40.
306. Hollman, P.C., et al., *Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man*. FEBS Lett, 1997. **418**(1-2): p. 152-6.
307. Xu, X., et al., *Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women*. J Nutr, 1994. **124**(6): p. 825-32.
308. Parveen, R., et al., *Oil based nanocarrier for improved oral delivery of silymarin: In vitro and in vivo studies*. Int J Pharm, 2011. **413**(1-2): p. 245-53.
309. Flaig, T.W., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients*. Investigational New Drugs, 2007. **25**(2): p. 139-146.
310. Feliciano, R.P., et al., *Absorption, Metabolism and Excretion of Cranberry (Poly)phenols in Humans: A Dose Response Study and Assessment of Inter-Individual Variability*. Nutrients, 2017. **9**(3).
311. Feliciano, R.P., et al., *Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols*. Arch Biochem Biophys, 2016. **599**: p. 31-41.
312. Rodriguez-Mateos, A., et al., *Bioavailability of wild blueberry (poly)phenols at different levels of intake*. Journal of Berry Research, 2016. **6**.
313. Konishi, Y. and S. Kobayashi, *Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers*. J Agric Food Chem, 2004. **52**(21): p. 6418-24.
314. Najmanová, I., et al., *Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats*. Mol Nutr Food Res, 2016. **60**(5): p. 981-91.
315. Conterno, L., et al., *Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects*. Eur J Nutr, 2019. **58**(1): p. 63-81.
316. Goldstein, D.S., et al., *Plasma Catechols After Eating Olives*. Clin Transl Sci, 2018. **11**(1): p. 32-37.
317. Koli, R., et al., *Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries*. J Agric Food Chem, 2010. **58**(7): p. 3927-32.
318. Rechner, A.R., et al., *The metabolic fate of dietary polyphenols in humans*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(2): p. 220-235.
319. Pimpão, R.C., et al., *Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit purée*. Br J Nutr, 2015. **113**(3): p. 454-63.
320. Thursby, E. and N. Juge, *Introduction to the human gut microbiota*. Biochem J, 2017. **474**(11): p. 1823-1836.
321. Frankenfeld, C.L., et al., *Serum steroid hormones, sex hormone-binding globulin concentrations, and urinary hydroxylated estrogen metabolites in post-menopausal women in relation to daidzein-metabolizing phenotypes*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. **88**(4-5): p. 399-408.
322. Valentová, K., et al., *Biotransformation of Silymarin Flavonolignans by Human Fecal Microbiota*. Metabolites, 2020. **10**(1): p. 29.
323. Sivaprakasam, S., et al., *Short-Chain Fatty Acid Transporters: Role in Colonic Homeostasis*. Compr Physiol, 2017. **8**(1): p. 299-314.
324. Fermini, B., et al., *L-type calcium channel antagonism - Translation from in vitro to in vivo*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2017. **84**: p. 86-92.
325. Squillaro, T., et al., *Nano-delivery systems for encapsulation of dietary polyphenols: An experimental approach for neurodegenerative diseases and brain tumors*. Biochem Pharmacol, 2018. **154**: p. 303-317.
326. Takagaki, A. and F. Nanjo, *Effects of Metabolites Produced from (-)-Epigallocatechin Gallate by Rat Intestinal Bacteria on Angiotensin I-Converting Enzyme Activity and Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats*. J Agric Food Chem, 2015. **63**(37): p. 8262-6.
327. Migkos, T., et al., *The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper*. Phytomedicine, 2019. **62**: p. 152974.
328. Mayo, B., L. Vázquez, and A.B. Flórez, *Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects*. Nutrients, 2019. **11**(9).

329. Matouk, A.I., et al., *Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013. **36**(2): p. 443-450.
330. Mosua, A., A.T.B. Numan, and N. Saeed, *Adjuvant use of silymarin in patients with hypertension and microalbuminuria*. *IRJP*, 2012(3): p. 95-97.
331. Vrba, J., et al., *Metabolism of flavonolignans in human hepatocytes*. *J Pharm Biomed Anal*, 2018. **152**: p. 94-101.

Přílohy

Předkládané publikace

1. Najmanová I, Pourová J, Vopršalová M, Pilařová V, Semecký V, Nováková L, Mladěnka P. *The flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat.* *Mol Nutr Food Res* 2016; 60(5): 981-91
2. Pourová J, Najmanová I, Vopršalová M, Migkos T, Pilařová V, Applová L, Nováková L, Mladěnka P. *Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo.* *Vascul Pharmacol.* 2018; 111:36-43
3. Najmanová I, Pourová J, Mladěnka P. *Mixture of phenolic metabolites of quercetin can decrease elevated blood pressure of spontaneously hypertensive rats even in low doses.* *Nutrients.* 2020; 12, 213
4. Migkos T, Pourová J, Vopršalová M, Auger C, Schini-Kerth V, Mladěnka P. *Biochanin A, the most potent of 16 isoflavones, induces relaxation of coronary artery through the calcium channel and cGMP-dependent pathway.* *Planta Medica. Planta Med* 2020 Jul;86(10):708-716
5. Pourová J, Applová L, Macáková K, Vopršalová M, Migkos T, Bentanachs R, Biedermann D, Petrásková L, Tvrdý V, Hrubša M, Karličková J, Křen V, Valentová K, Mladěnka P. *The effect of silymarin flavonolignans and their sulfated conjugates on platelet aggregation and blood vessels ex vivo.* *Nutrients.* 2019; 11, 2286
6. Porcu EP, Cossu M, Rassu G, Giunchedi P, Cerrib G, Pourová J, Najmanová I, Migkos T, Pilařová V, Nováková L, Mladěnka P, Gavini E. *Aqueous injection of quercetin: An approach for confirmation of its direct in vivo cardiovascular effects.* *Int J Pharm* 2018; Feb 21;541(1-2):224-233