

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



VASODILATAČNÍ ÚČINKY DERIVÁTŮ KATECHOLU *EX VIVO*

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2022

Kristýna Šmídová

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

V Hradci Králové dne

.....

Kristýna Šmídová

Tímto děkuji své školitelce doc. PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a věcné rady při zpracování této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Patrícii Dias, MSc. za vstřícnost a pomoc s experimentální částí této práce. Dále děkuji své rodině za podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Kristýna Šmídová

Školitelka: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vasodilatační účinky derivátů katecholu *ex vivo*

Polyfenoly včetně flavonoidů představují širokou skupinu přírodních látek s významnými účinky na lidské zdraví včetně prevence kardiovaskulárních onemocnění. Význam mají také jejich metabolity, jejichž klinické účinky mohou být dokonce větší, než jaké měla původní sloučenina. Cílem této práce bylo ověřit vasodilatační účinky jednoho typu metabolitů, derivátů katecholu, na hladký cévní sval a u nejučinnější látky následně otestovat mechanismus účinku. K výzkumu byla použita standardizovaná metoda *ex vivo* izolované tkáně izolovaných aortálních kroužků potkana kmene Wistar s isotonickou registrací kontrakce a dilatace tkáně (software S.P.E.L. Advanced Kymograph Software). Nejučinnějším vasodilatátorem po prekontrakci noradrenalinem byl 3-methoxykatechol ($EC_{50} = 7,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Při testování mechanismu účinku jsme zjistili, že tento účinek je na endotelu nezávislý, a že 3-methoxykatechol potencuje vasodilatační účinek nitroprusidu sodného. Konkrétní mechanismus se nám odhalit nepodařilo a měly by se proto provést další experimenty. Jako možné se jeví působení na dráze NO/sGC/cGMP/PKG.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Kristýna Šmídová

Supervisor: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Vasodilatory effects of catechol derivatives *ex vivo*

Polyphenols, including flavonoids, are a broad group of natural substances with significant effects on human health, including the prevention of cardiovascular diseases. Their metabolites can also be active, with clinical effects which may even exceed those of the parent compounds. The aim of this diploma thesis was to verify vasodilatory effects of one flavonoid metabolite type, a series of catechol derivatives and elucidate the mechanism of action of the most potent substance. The established *ex vivo* method of isolated aortic rings of Wistar rats with isotonic registration of tissue contraction and dilation (software S.P.E.L. Advanced Kymograph Software) was used. In the experiments with the rat aorta precontracted by norepinephrin, 3-methoxycatechol was the most effective vasodilator ($EC_{50} = 7,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$). In the mechanistic study, we found out that its effect is endothelium-independent, and that 3-methoxycatechol enhances the vasodilatory effect of sodium nitropruside. However, the specific mechanism responsible for vasodilation was not identified and further experiments should be carried out in future. An effect on the NO/sGC/cGMP/PKG pathway seems possible.

OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK	9
2.	ÚVOD.....	12
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	14
3.1.	Kardiovaskulární systém.....	14
3.1.1.	Srdce.....	14
3.1.2.	Cévní systém.....	15
3.1.2.1.	Struktura cévní stěny	15
3.1.2.2.	Typy cév.....	18
3.1.2.3.	Rozdělení cév podle funkce	22
3.2.	Hladký cévní sval.....	24
3.2.1.	Mechanismus kontrakce hladkého svalu	25
3.3.	Mechanismy regulace tonu cévního svalstva.....	27
3.3.1.	Lokální mechanismy.....	27
3.3.1.1.	Endotelová regulace	27
3.3.1.1.1.	Endotelin.....	28
3.3.1.1.2.	Oxid dusnatý.....	28
3.3.1.1.3.	Prostanoidy.....	29
3.3.1.2.	Enzymatická regulace.....	32
3.3.1.2.1.	Renin-angiotensin-aldosteronový systém.....	32
3.3.1.2.2.	Kininový systém.....	34
3.3.2.	Centrální mechanismy.....	35
3.3.2.1.	Hormonálně – neurogení regulace.....	35
3.3.2.1.1.	Autonomní nervový systém	35
3.3.2.1.2.	Katecholaminy.....	36
3.3.2.1.3.	Acetylcholin	40

3.3.2.1.4.	Serotonin	41
3.3.2.1.5.	Vazopresin.....	42
3.3.2.1.6.	Natriuretické peptidy.....	43
3.4.	Flavonoidy.....	46
3.4.1.	Charakteristika flavonoidů	46
3.4.2.	Struktura a biosyntéza flavonoidů.....	46
3.4.3.	Účinky flavonoidů	48
3.4.4.	Metabolismus flavonoidů	49
3.4.5.	Katecholy.....	51
4.	CÍL PRÁCE	52
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	53
5.1.	Pokusná zvířata	53
5.2.	Použité vybavení.....	53
5.2.1.	Přístroje a pomůcky.....	53
5.2.2.	Chemikálie.....	55
5.3.	Metodika	59
5.3.1.	Průběh experimentu	59
5.3.2.	Zhodnocení naměřených dat.....	65
6.	VÝSLEDKY	67
7.	DISKUSE	74
8.	ZÁVĚR	79
9.	LITERATURA.....	80

1. SEZNAM ZKRATEK

A	adrenalin
AA	kyselina arachidonová
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ADH	antidiuretický hormon (vazopresin)
Ach	acetylcholin
ANP	atriální natriuretický peptid
ANS	autonomní nervový systém
AP	akční potenciál
AT1, AT2 receptor	receptory pro angiotensin II
ATP	adenosintrifosfát
B1, B2 receptor	receptory pro bradykinin
BNP	mozkový natriuretický peptid
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNP	natriuretický peptid typu C
CNS	centrální nervový systém
COMT	katechol – O – methyltransferáza
COX1, COX2	cyklooxygenáza 1, cyklooxygenáza 2
D	dopamin
D ₁₋₅ receptor	receptory pro dopamin
DAG	diacylglycerol
DOPA	dihydroxyfenylalanin
EDHF	endotelový hyperpolarizační faktor
EDRF	endoteliální relaxační faktor

EMT	extraneuronální monoaminový transportér
ET, ET-1, ET-2, ET-3	endotelin, endotelin 1, endotelin 2, endotelin 3
ET _A , ET _B receptor	receptory pro endotelin
GIT	gastrointestinální trakt
G _i , G _q , G _s receptor	receptory spřažené s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
5-HT ₁₋₇ receptor	receptory pro serotonin
IP ₃	inositoltrifosfát
IP receptor	receptor pro prostacyklin
KVO	kardiovaskulární onemocnění
KVS	kardiovaskulární systém
M ₁₋₃ receptor	muskarinové receptory
MAO A, MAO B	monoaminoxidáza A, monoaminoxidáza B
MLC	lehké myozinové řetězce
MLCK, αMLCK	lehkořetězcová myozinkináza, (aktivní)
MP	lehkořetězcová myozinfosfatáza
NA	noradrenalin
NET	norepinefrinový transportér (transportér pro adrenalin)
NO	oxid dusnatý
(e, n, i) NOS	syntáza oxidu dusnatého (endotelová, neuronální, inducibilní)
NPR-A, NPR-B,	receptory pro natriuretické peptidy
NPR-C receptor	
NTS	nitroprusid sodný

p.a.	pro analysis
PGE ₂	prostaglandin E ₂
PGG ₂	prostaglandin G ₂
PGH ₂	prostaglandin H ₂
PGI ₂	prostacyklin I ₂
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PAK	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PKG	proteinkináza G
PLA ₂	fosfolipáza A ₂
PLC	fosfolipáza C
PNS	periferní nervový systém
RAAS	renin – angiotensin – aldosteronový – systém
sGC	solubilní guanylátcykláza
SR	sarkoplazmatické retikulum
SS	srdeční selhávání
TK	krevní tlak
TRP	kanály s přechodným receptorovým potenciálem (z angl. transient receptor potential)
TXA ₂	tromboxan A ₂
TP receptor	receptor pro tromboxan
V1, V2 receptor	receptory pro vazopresin

2. ÚVOD

Základní vlastností živých organismů je zachování homeostázy neboli stálosti vnitřního prostředí, a to i při proměnlivých metabolických nárocích či měnících se podmínkách okolí. Hlavní podíl na udržení homeostázy má kardiovaskulární systém (KVS) (Rokyta 2000).

KVS je složen ze srdce a krevních a lymfatických cév a plní mnoho dalších životně důležitých funkcí (Konrádová et al. 2000). Jeho funkce mohou být regulovány dvěma typy mechanismů – lokálními a centrálními (Trojan 2003).

Z lokálních mechanismů má velký význam endotelová a myogenní regulace (Trojan 2003). Endotel produkuje látky, které se podílejí na srážení krve, produkuje růstové faktory pro dělení svalových buněk, účastní se zánětlivé reakce, reguluje cévní tonus atd. Pro správnou funkci endotelu musí být rovnováha mezi vasodilatačními látkami (oxid dusnatý, prostacyklin PGI_2) a vasokonstrikčními látkami (angiotensin II, endotelin, tromboxan A_2). Při narušení rovnováhy vzniká endoteliální dysfunkce, která přispívá ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění (KVO) a zvýšení mortality na tato onemocnění (Púzserová 2016, Trojan 2003, Vita 2005). Myogenní regulace spočívá ve změně průsvitu cévy, čímž reguluje průtok krve tkání a má také vliv na krevní tlak (Kittnar 2011).

Mezi nejvýznamnější centrální mechanismy patří regulace sympatikem (prostřednictvím mediátorů jako je adrenalin a noradrenalin působících na alfa a beta receptory) a parasympatikem (jehož hlavním působkem je acetylcholin ovlivňující muskarinové a nikotinové receptory) (Trojan 2003, Shier et al. 2007).

V posledních desetiletích razantně narůstal počet lidí s KVO, která se tak zařadila na první místo příčin mortality ve vyspělých i rozvojových zemích (Mladěnka et al. 2010, Zipes et al. 2018).

Nejběžnější KVO je hypertenze. Jedná se o multifaktoriální onemocnění, které při přetrvávání může poškozovat krevní cévy. Ve spojení s dalšími rizikovými faktory (jako je kouření, nevhodná strava, nedostatek fyzické aktivity, vysoký cholesterol typu LDL, nízký HDL a další) vede ke vzniku aterosklerózy a dalších KVO s aterosklerotickým podkladem (př.: ischemická choroba srdeční,

ischemická choroba dolních končetin, akutní infarkt myokardu) (Vlček a Fialová 2010, Katzung 2018). Všechny tyto problémy souvisejí pravděpodobně s působením oxidačního stresu na organismus (Mladěnka et al. 2010).

Vývoj včasné diagnostikovaného KVO lze zvrátit i nefarmakologickou léčbou, většinou je však potřeba využít různá léčiva, kterých sice existuje mnoho, ale vzhledem k závažnosti těchto onemocnění je snaha vyvíjet stále nová (Švihovec et al 2018, Klener 2012). Slibné se zdají být přírodní látky, například flavonoidy (Bravo 1998).

Flavonoidy patří mezi polyfenolické sekundární metabolity rostlin, v přírodě hojně rozšířené (Spilková 2016, Kim a Je 2017). Jednotlivé flavonoidy se svou strukturou liší a dělí se tak do několika různých skupin. Rovněž spektrum jejich účinků je velmi široké, využívají se zejména v prevenci některých chronických onemocnění, především KVO (Spilková 2016, Gross 2004). Důležité je zohlednit také metabolismus flavonoidů, protože i jejich metabolity mohou vyvolávat klinicky zajímavé účinky, některé dokonce větší než původní sloučenina (Viskupičová et al. 2008, Cassidy a Minihane 2017). Jejich mechanismus zatím většinou nebyl plně objasněn (Mladěnka et al. 2010).

Mezi metabolity flavonoidů patří také katecholy. V této práci jsme se zaměřili na vasodilatační účinky jejich derivátů a následně na možný mechanismus tohoto účinku. Pro výzkum jsme zvolili standardizovanou metodu *ex vivo* na izolované aortě potkana.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Kardiovaskulární systém

Kardiovaskulární systém je jedním z nejdůležitějších systémů lidského těla. Zajišťuje oběh krve a tok mízy. Dodává tím kyslík a nutriční látky do různých tělních kompartmentů a odvádí oxid uhličitý a další odpadní látky buněk z organismu (Balko et al. 2017, Konrádová et al. 2000). Také se podílí na transportu hormonů a protilátek, udržení acidobazické rovnováhy, termoregulaci a sehrává roli v imunitních procesech (Rokyta 2000, Púzserová 2016).

KVS se skládá ze dvou propojených vaskulárních systémů – lymfatického a krevního systému. Součástí lymfatického vaskulárního systému je soustava lymfatických (mízních) cév (Konrádová et al. 2000, Balko et al. 2017). Lymfatické cévy začínají slepě v mezibuněčných štěrbinách jako lymfatické kapiláry, které vzájemně anastomozují a vytvářejí větší mízní cévy (Čihák 1997). Ty pak ústí do krevního oběhu v oblasti velkých žil v blízkosti srdce. Jejich úkolem je vracet přebytečnou tekutinu z tkáňových prostor do krevního oběhu.

Krevní vaskulární systém tvoří srdce a krevní cévy (Konrádová et al. 2000, Balko et al. 2017).

3.1.1. Srdce

Srdce je dutý svalový orgán, který pracuje nepřetržitě jako pumpa. Rytmicky se kontrahuje (systola) a relaxuje (diastola) a tím pohání krev do celého těla (Čihák 1997, Petrovický 2001, Trojan 2003).

Je tvořeno čtyřmi dutinami (dvěma síněmi a dvěma komorami). Do pravé síně je přiváděna odkysličená krev horní a dolní dutou žilou, odtud teče do pravé komory, ze které je při systole vypuzena do plic. V plicích dojde k okysličení krve a jejímu návratu do levé síně, odkud teče do levé komory (malý plicní oběh).

Okysličená krev vpuštěná z levé síně do levé komory je při systole vháněna do aorty a dále do tepen a kapilár celého organismu, z nichž po odevzdání O₂ a nutričních látek v síti kapilár přejde do žil vedoucích krev opět do pravé síně

(velký krevní oběh). Zpětnému toku krve zabraňují chlopně (Petrovický 2001, Dylevský 2019).

Stěna srdce je tvořena třemi vrstvami. Vnitřní vrstvu představuje endokard, tenká blána, jež vytváří výstelku srdce. Střední vrstvou srdeční stěny je myokard (srdeční svalovina), tvořený z příčně pruhovaných svalových vláken. Síťovitá struktura myokardu umožňuje rychlý rozvod nervových vzruchů a zajišťuje tak pravidelné stahy srdce (Dylevský 2019). Zevní vrstvu srdce tvoří epikard, serosní blána, která podél cév vstupujících a vystupujících ze srdce přechází v perikard (vazivový obal). Prostor mezi epikardem a perikardem je vyplněn tekutinou, která umožňuje klouzavý pohyb obou listů (Čihák 1997, Dylevský 2019).

3.1.2. Cévní systém

Cévní systém je soustava trubic různých rozměrů, jimiž proudí tekutina (krev – v uzavřeném krevním vaskulárním systému či míza – v otevřeném lymfatickém vaskulárním systému) (Čihák 1997).

3.1.2.1. Struktura cévní stěny

Obecně se cévní stěna skládá ze tří vrstev – *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia*. V různých částech cévního systému se složení dílčích vrstev cévní stěny liší podle jednotlivých typů cév a je přizpůsobeno jejich funkcím (Čihák 1997, Kittnar 2011). Schématické rozložení vrstev cévní stěny je znázorněno na Obr. 1.

Tunica intima (interna)

Tunica intima je vnitřní vrstva tvořená endotelem a subendotelovou vrstvou. Buňky endotelu v jedné vrstvě vystýlají vnitřní povrch cév. Jsou polygonální, ploché s centrálně uloženým jádrem, protažené zpravidla ve směru toku krve. Obvykle jsou uloženy na bazální lamině. Mezi jednotlivými endotelovými buňkami se nachází četné těsné spoje (tzv. *zonulae occludentes*) (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997). Svojí stavbou vytvářejí endotelové buňky hladký a nesmáčivý povrch, který odděluje krev od hladkého svalu cévy (Dylevský 2019, Kittnar 2011).

Subendotelovou vrstvu tvoří podélně uspořádané řídké kolagenní vazivo a zřídka také buňky hladké svaloviny (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997).

Tunica media

Střední vrstva – *tunica media* je složena převážně z koncentricky uspořádaných vrstev hladkosvalových buněk (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997). Tyto vrstvy hladké svaloviny dodávají cévní stěně pružnost a umožňují měnit průsvit cév a regulovat průtok krve (Dylevský 2019).

Buňky hladké svaloviny produkují mezibuněčnou hmotu, jejíž součástí je hlavně glykosaminoglykan chondroitinsulfát a proteoglykany, které glykosaminoglykan obsahují. Další složkou *tunica media* je proměnlivé množství elastických a kolagenních vláken (nachází se zde hlavně kolagen III. typu) (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997). Elastická vlákna zde vytvářejí blanky, ve kterých se nacházejí otvory (tzv. *membranae fenestrae*) umožňující průnik živin do hlubších vrstev stěny cévy. Elastické struktury oddělují *tunica media* od *tunica intima* a *tunica adventitia* formováním *membrana elastica interna* a *membrana elastica externa* (Konrádová et al. 2000).

Tunica adventitia (externa)

Tunica adventitia je povrchová vrstva cévy tvořená fibrilárním vazivem složeným z podélně orientovaných elastických a kolagenních vláken (zejména kolagen I. typu). Jsou zde přítomny také fibroblasty, adipocyty i hladkosvalové buňky. Adventicie postupně proniká do vaziva orgánu, jímž céva prostupuje a pružně ji tak fixuje k okolí (Čihák 1997, Junqueira et al. 1997).

Vasa vasorum

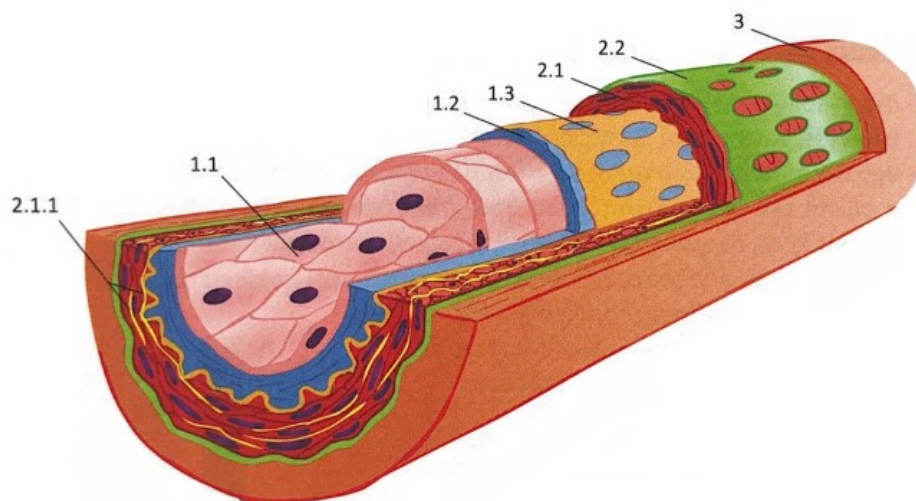
Výživa stěny drobných cév je zprostředkovávána difuzí nutrientů a kyslíku z krve, jež danou cévou protéká. Větší cévy (s průměrem nad 1 mm) mají příliš silné stěny na to, aby jimi procházely živiny a O₂ difuzí, proto mají ve stěnách vyvinutý vlastní systém cév, který se označuje jako *vasa vasorum* (cévy cév). *Vasa vasorum* mohou vznikat jako větve vlastní arterie, kterou zásobují nebo arterie sousední. Tyto cévy se bohatě větví ve vrstvě *tunica adventitia* a zevní části *tunica media*. Vzhledem k tomu, že ve venózní krvi je nižší koncentrace kyslíku

i živin, nachází se *vasa vasorum* častěji ve stěnách vén než arterií (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997).

Inervace

Většina krevních cév, které ve své stěně obsahují buňky hladkého svalstva, má vyvinutou síť nemyelinizovaných sympatických vazomotorických nervových vláken. Mediátorem je noradrenalin (NA), jehož uvolnění z těchto nervů vede k vasokonstrikci. V arteriích nezasahují většinou eferentní nervová vlákna až do medie a NA musí dál difundovat, aby se dostal k hladkým svalovým buňkám. Ve vénách se nervová zakončení vyskytují v adventicii i v medii, ale celková hustota inervace je menší než v arteriích (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997).

Všechny cévy mají relativně velkou schopnost regenerace (Konrádová et al. 2000).



Obr. 1 Obecná struktura cévní stěny

1 – tunica intima: 1.1 – endotel, 1.2 – subendotelová vrstva, 1.3 – membrana elastica interna; 2 – tunica media: 2.1 – hladká svalovina, 2.1.1 – membranae fenestratae elasticae, 2.2 – membrana elastica externa; 3 – tunica adventitia

Převzato z: Balko et al. (2017)

3.1.2.2. Typy cév

Mezi cévy řadíme arterie, arterioly, vény, venuly, kapiláry, prekapilární sfinktery a arteriovenózní zkraty (anastomózy). Arterie se větví do tenčích až nejtenčích arteriol a vedou krev ze srdce do kapilár. Kapiláry přecházejí ve venuly a spojují tak arteriální a žilní řečiště. Venuly se následně sbírají ve vény, které vedou krev z kapilár do srdce (Čihák 1997, Shier et al. 2007).

Arterie

Arterie mají pevnou a pružnou stěnu, která musí být přizpůsobená na pulsové nárazy krve vypuzované srdcem. Krev jimi proudí rychle (nejrychleji aortou), rychlost průtoku se zpomaluje postupným větvením řečiště a stává se kontinuální (Čihák 1997). Rozeznáváme dva typy arterií – arterie elastického typu a arterie svalového typu.

Mezi arterie svalového typu patří většina arterií lidského těla. *Tunica intima* je zde složena z endotelu a subendotelové vrstvy, která může obsahovat i hladkosvalové buňky. *Tunica media* je tvořena cirkulárně uspořádanými vrstvami hladkého svalstva. Těchto vrstev může být až čtyřicet v závislosti na průměru cévy. Intimu od medie odděluje dobře vyvinutá *membrana elastica interna* (Martínek a Vacek 2009, Konrádová et al. 2000). Ve větších arteriích svalového typu je přítomna také *membrana elastica externa*. *Tunica adventitia* je tvořena především elastickými a kolagenními vlákny, dále také malým množstvím fibroblastů a adipocytů. V adventicii se nachází lymfatické kapiláry, *vasa vasorum* a nervová vlákna, která někdy pronikají do vnějších částí *tunica media* (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997).

K arteriím elastického typu patří arterie velkého kalibru jako je aorta a plicnice (včetně jejich hlavních větví). Díky vysokému obsahu elastinu mají nažloutlou barvu a mohou zastávat funkci pružníku (Balko et al. 2017, Martínek a Vacek 2009, Konrádová et al. 2000). *Tunica intima* je silnější než u arterií svalového typu. Její subendotelová vrstva je silná a obsahuje vazivová vlákna, která hrají významnou roli při deformaci endotelu během kontrakcí a dilatací arterií. *Tunica media* obsahuje elastické blanky (*membranae fenestratae*), jejichž počet roste s věkem. Blanky se postupně stávají metabolicky inertní a díky dalšímu ukládání elastinu sílí. V medii se nacházejí též hladké svalové buňky, které se na elastické

blanky upínají. *Tunica adventitia* je tenká, tvořená převážně elastickými a kolagenními vlákny (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997).

Aorta

Aorta neboli srdečnice je hlavní tepnou lidského těla a ze všech arterií má největší průměr (Shier et al. 2007, Holibková a Laichman 2004). Vystupuje z levé srdeční komory a tvoří ji tři úseky. Prvním úsekem je *aorta ascendens*, která se ohýbá v *arcus aortae* – druhý úsek, jež dále pokračuje v poslední část označovanou jako *aorta descendens*. *Aortu descendens* dále členíme na *aorta thoracica* (hrudní část) a *aorta abdominalis* (část v břišní dutině) (Čihák 1997). Jak již bylo zmíněno výše, z histologického hlediska patří aorta do skupiny velkých arterií elastického typu (Junqueira et al. 1997).

Arterioly

Arterioly jsou nejtenčí tepny. Jsou tvořeny endotelem a tenkou vrstvičkou hladkých svalových buněk, jejichž povrch pokrývá fibroelastická vrstva (Čihák 1997). U větších arterií je endotel od svalových buněk oddělen pomocí *membrana elastica interna*, u menších arterií tato membrána chybí (Konrádová et al. 2000). Stěna arterií je relativně silná s malým průsvitem. Svůj průsvit mohou díky hladké svalovině měnit a regulovat tak průtok krve cévním řečištěm (Čihák 1997). Konečné segmenty arterií obsahují pouze malé množství svalových buněk a nazývají se prekapiláry. Prekapiláry následně přecházejí v kapiláry (Čihák 1997, Petrovický 2001).

Kapiláry

Kapiláry neboli vlasečnice jsou cévy s nejmenším průměrem (7 – 9 μm) (Shier et al. 2007, Konrádová et al. 2000). Jsou složeny pouze z jediné vrstvy endotelových buněk. Mezi sebou jsou endotelové buňky spojené pomocí *zonulae occludentes*, případně pomocí desmosomů či nexů (Junqueira et al. 1997). Díky tenké stěně a pomalému krevnímu průtoku jsou ideálním místem pro výměnu látek mezi krví a přilehlými tkáněmi (Konrádová et al. 2000).

Z vnější strany na ně nasedají buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky tzv. pericyty. Pericyty se okolo kapiláry bohatě větví a obklopují ji. Vytvářejí si vlastní bazální laminu, která může místy splývat s bazální laminou buněk

endotelu (Lichnovský et al. 2009, Konrádová et al. 2000). V cytoplazmě pericytů se nachází aktin, myozin a tropomyosin, což naznačuje, že mohou být schopny kontrakce. Pericyty v kapilárách zastupují vrstvu *tunica media*. *Tunica adventitia* je nahrazena vrstvičkou kolagenních vláken.

Podle struktury endotelu a přítomnosti (či nepřítomnosti) bazální laminy můžeme kapiláry rozdělit do čtyř skupin (Junqueira et al. 1997).

Somatické (souvislé) kapiláry

Jsou to kapiláry se souvislou výstelkou bez fenestrací a pórů. Na povrchu endotelových buněk a v cytoplazmě se vyskytují pinocytární váčky sloužící k transportu makromolekul endotelovou buňkou. Nejčastěji se tento typ kapilár vyskytuje v nervové a svalové tkáni.

Viscerální (fenestrované) kapiláry

Ve stěnách endotelových buněk se nacházejí fenestrace překryté velmi tenkou přepážkou – diafragmou. Mají dobře vyvinutou bazální laminu a nachází se v místech s rychlou výměnou látek mezi tkáněmi a krví (ledviny, endokrinní žlázy) (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997).

Kapiláry s póry

Tyto kapiláry rovněž obsahují fenestrace a póry. Od fenestrovaných kapilár se liší nepřítomností diafragmy. Mají silnou souvislou bazální laminu a jsou typické pouze pro glomeruly ledvin (Junqueira et al. 1997, Balko et al. 2017).

Sinusoidní kapiláry (sinusoidy)

I pro tento typ kapilár je charakteristická přítomnost četných fenestrací bez diafragmy. Bazální lamina obvykle chybí. Zpomalují tok krve, čímž výrazně usnadňují látkovou výměnu. V jejich okolí se nacházejí makrofágy. Vyskytují se například v kostní dřeni či játrech (Konrádová et al. 2000, Junqueira et al. 1997).

Kapiláry se na konci svého řečiště spojují a formují se v tzv. postkapiláry (postkapilární venuly), jimiž mohou do tkání, vzhledem k povaze *zonulae occludentes*, penetrovat tekutiny a krevní elementy (Konrádová et al. 2000).

Venuly

Na postkapilární venuly navazují venuly sběrací, jejichž průměr se s přechodem na svalové (muskulární) venuly pozvolna zvětšuje. Endotel sběracích venul je ještě obalen vrstvou pericytů jako je tomu u kapilár a postkapilár. Endotelové buňky svalových venul jsou namísto pericytů obaleny buňkami hladkého svalstva. Můžeme zde již rozeznat tenkou *tunica adventitia*. Spojením několik svalových venul vznikají venuly (Konrádová et al. 2000, Balko et al. 2017). Venuly mají průměr 0,2 – 1 mm a jejich stěna se skládá opět ze tří vrstev. *Tunica intima* obsahuje endotel a tenkou vrstvu subendotelového vaziva. *Tunica media* je velmi tenká, tvořená několika málo vrstvami hladké svaloviny (u některých venul může svalovina chybět). Nejsilnější vrstvou venul je *tunica adventitia*, složená z kolagenního vaziva obsahujícího četná kolagenní vlákna (Konrádová et al. 2000, Balko et al. 2017).

V porovnání s arterioly stejného kalibru jsou stěny venul tenké (Junqueira et al. 1997).

Vény

Splýváním venul postupně vznikají vény malého a středního kalibru, které se spojují a utváří velké žíly (Balko et al. 2017).

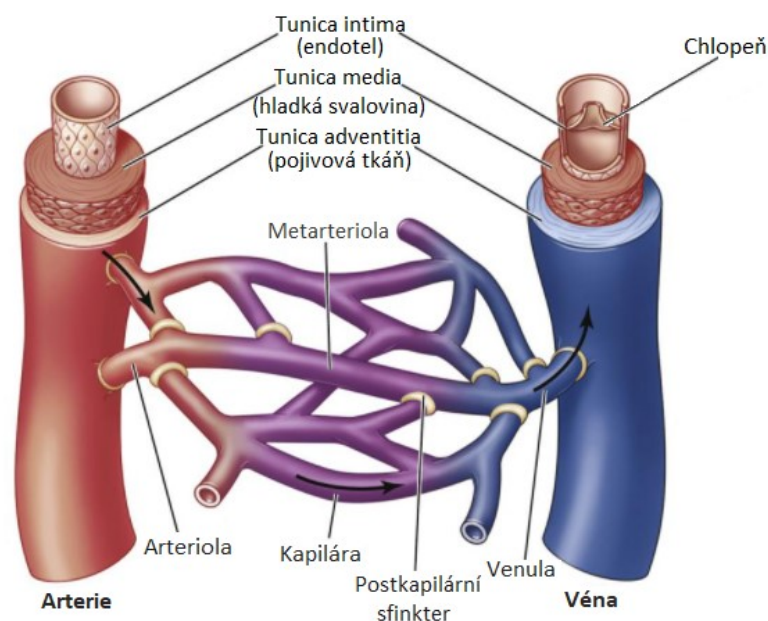
Jejich stěnu tvoří *tunica intima*, složená z endotelu a subendotelové vrstvy. Vény velkého kalibru mají, v porovnání s malými a středními vénami, mnohem silnější subendotelovou vrstvu, která navíc obsahuje hladké svalové buňky. Další vrstvou je *tunica media*. Skládá se převážně z drobných svazečků (malé, střední vény) či slabých vrstev hladkých svalových buněk (velké vény). Oproti medii arterií je velmi tenká, a není tak schopná udržet tvar vény. Nejširší vrstvou stěny vén je *tunica adventitia*. Tvoří ji longitudinálně uspořádané svazky hladkosvalových buněk, které ji zároveň zpevňují (Konrádová et al. 2000, Balko et al. 2017). Charakteristickým znakem malých a středních vén je přítomnost chlopní.

Chlopně jsou kapsovitě vychlípeniny *tunica intima* vyztužené vazivem. Jejich funkcí je, ve spolupráci s hladkou svalovinou medie a kosterní svalovinou okolních svalů, usměrňování toku krve směrem k srdci. V žilách je totiž kvůli nižšímu tlaku návrat krve k srdci náročnější (Balko et al. 2017, Čihák 1997).

Podle lokalizace můžeme vény rozdělit na povrchové a hloubkové. Povrchové vény jsou umístěny v podkožním vazivu, místy mohou být dokonce viditelné pod kůží. Obvykle nedoprovázejí arterie. Hloubkové vény zpravidla doprovází arterie i nervy (Čihák 1997).

Díky velkému objemu (až 70 % celkového objemu krve) a pomalému průtoku představují žíly z funkčního hlediska rezervoáry, ze kterých je krev při potřebě rychle dodána do oběhu (Junqueira et al. 1997, Čihák 1997).

Na Obr. 2 si lze všimnout rozdílné stavby stěny arterií a vén a také naznačeného směru toku krve cévami.



Obr. 2 Struktura stěny arterie a vény s vyznačením směru toku krve cévami

Upraveno podle: Solomon (2015) a Shier et al. (2007)

3.1.2.3. Rozdělení cév podle funkce

Podle funkce rozdělujeme 6 typů cév:

Pružník

Jako pružníky se označují střední a velké elastické tepny. Obsahují především elastická vlákna, glykoproteiny a glykosaminy. Díky tomu vynikají mimořádnou pružností, která jim umožňuje přeměnit nárazový přítok krve na její kontinuální proudění. Tato schopnost se projevuje nejvíce u aorty (Kittnar 2011, Langmeier 2009).

Rezistenční (odporové) cévy

Regulují průtok krve tkáněmi. Řadíme mezi ně arterioly a venuly. Arterioly (tzv. prekapilární rezistenční cévy), které mohou díky silné stěně se značným množstvím hladké svaloviny měnit průsvit a tím regulovat distribuci krve mezi různé orgány. Venuly (tzv. postkapilární rezistenční cévy) regulují tlakový rozdíl mezi prekapilárními a postkapilárními rezistenčními cévami. Tím řídí hydrostatický tlak krve v kapilárách a podílejí se tak na filtraci a reabsorpci. Tvoří však jen malou část cévní rezistence (Kittnar 2011, Langmeier 2009).

Prekapilární sfinktery

Prekapilární sfinktery jsou konečnými úseky prekapilárních arteriol. Mají rozhodující vliv na počet otevřených kapilár a tím pádem i na velikost kapilární plochy, na níž dochází k výměně tekutiny mezi kapilárami a intersticiem (Kittnar 2011, Langmeier 2009).

Kapiláry

Představují rozhraní mezi krví a tkání, kde se uskutečňuje výměna látek mezi krví a intersticiální tekutinou. Nejsou schopny vlastní kontrakce a ke změně jejich průsvitu dochází pasivně (v závislosti na stavu rezistenčních cév a prekapilárních sfinkterů) (Kittnar 2011, Langmeier 2009).

Arteriovenózní zkratky

Nacházejí se pouze v některých tkáních, většinou mezi malými cévami. Zajišťují rychlý přesun krve z tepen do žil, obchází přitom kapiláry. Když jsou arteriovenózní zkratky otevřeny, průtok krve kapilárami se v dané oblasti sníží či zastaví, zároveň se však zrychluje průtok tkání (Kittnar 2011, Konrádová et al. 2000).

Kapacitní cévy

Do této skupiny patří převážně žíly, které díky své schopnosti pojmout značný objem krve, slouží jako její rezervoáry. Vzhledem k tomu, že se stále mění potřeba distribuce krve v jednotlivých tkáních a orgánech, jsou takové rezervoáry nezbytné. Zabezpečují také žilní návrat a mají tak vliv na funkci srdce (Kittnar 2011, Langmeier 2009).

3.2. Hladký cévní sval

Podle morfologických znaků a funkce rozlišujeme tři typy svaloviny – kosterní příčně pruhovanou svalovinu, srdeční svalovinu a hladkou svalovinu (Junqueira et al. 1997).

Stěny všech cév s výjimkou kapilár a stěny vnitřních orgánů jsou tvořeny hladkou svalovinou (Trojan 2003). Základní stavební jednotkou hladké svaloviny jsou leiomyocyty – protáhlé vřetenovité buňky s jedním jádrem, uloženým centrálně v nejširší části buňky. Po stranách se buňky zužují (Junqueira et al. 1997, Rokyta 2000, Balko et al. 2017). Jejich průměrná délka je 20 – 50 μm , je závislá na umístění hladké svaloviny a funkčním stavu daného orgánu (např. děloha v těhotenství může dosahovat délky dokonce 500 μm) (Balko et al. 2017).

Každá buňka je na povrchu kryta buněčnou membránou – sarkolemou a uvnitř vyplněna cytoplazmou – sarkoplazmou (Balko et al. 2017). Na membráně se nachází velké množství receptorů, které reagují na neurotransmitery uvolňované z autonomních nervových zakončení i na další působky (např. hormony). Podráždění hladké svaloviny však mohou způsobit i mechanické vlivy, jako je například porušení cévní stěny, jež vyvolá reflexní vasokonstrikci (Kittnar 2011, Balko et al. 2017).

V sarkoplazmě se nacházejí tenká, nepravidelně uspořádaná aktinová a myozinová myofilamenta (Shier et al. 2007, Konrádová et al. 2000). Aktinová myofilamenta se upínají do denzních tělísek, která mohou být kromě sarkoplazmy umístěna i na sarkolemě. Jsou to oválné útvary, které jsou vzájemně propojené dezminem, čímž utváří síť a zajišťují tak v buňce rovnoměrnou kontrakci tahem za sousední tělíska. Myozin se nachází uprostřed mezi dvěma denzními tělísky (Balko et al. 2017). Buňky jsou uspořádány tak, aby k sobě vždy přiléhala úzká část jedné buňky a široká část buňky sousedící. Díky tomuto seskupení do sebe přesně zapadají a svalovina je tak kompaktní (Konrádová et al. 2000, Balko et al. 2017). Mezi buňkami se navíc nachází řídké kolagenní vazivo, endomyzium, které mezi sebou jednotlivé buňky spojuje a zprostředkovává přenos sil vznikajících během stahu (tím zajišťuje hladký průběh kontrakce) (Balko et al. 2017).

Hladkou svalovinu můžeme rozdělit na dva typy, a to na útrobní hladký sval a vícejednotkový hladký sval (Rokyta 2000).

Vícejednotkový hladký sval

Tento typ hladkého svalu je tvořen několika buňkami, které na sobě nejsou závislé. Mají každá svou vlastní inervaci a mohou se každá zvlášť kontrahovat (Rokyta 2000, Shier et al. 2007).

Útrobní hladký sval

Útrobní hladký sval se skládá až z milionů buněk, které jsou mezi sebou propojené pomocí speciálních vodivých spojů (gap-junctions). Tyto spoje tak umožňují vzájemný transfer akčních potenciálů a rychlé šíření kontrakce z buňky na buňku. Nemusí tak být inervovaná každá buňka zvlášť (Balko et al. 2017, Rokyta 2000, Kittnar 2011). Tento komplex buněk se označuje jako tzv. soubuní, syncytium. Z funkčního hlediska se syncytium chová jako jedna jednotka (někdy se proto tento typ svalu označuje jako jednojednotkový sval) (Kittnar 2011).

Žádný typ hladké svaloviny nelze ovládat vůlí, jeho činnost je řízena především vegetativními nervy (Rokyta 2000, Čihák 2011).

3.2.1. Mechanismus kontrakce hladkého svalu

Kontrakce na molekulární úrovni:

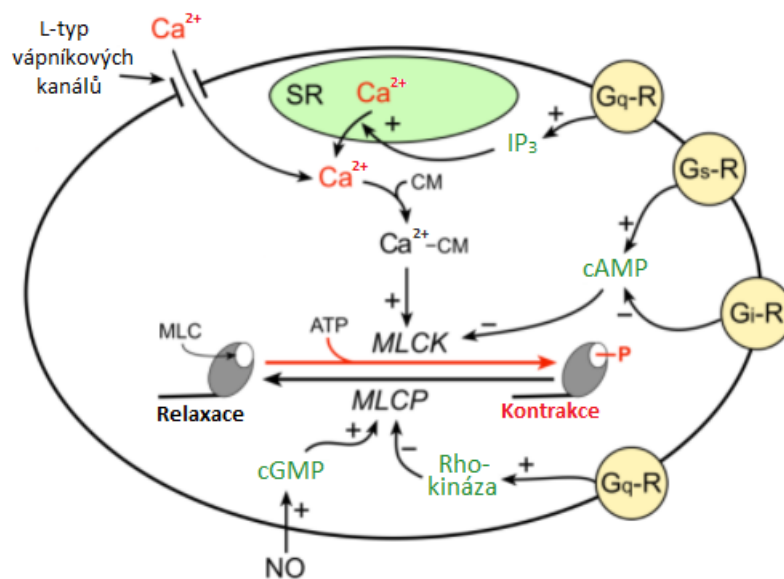
Klíčovou roli při kontrakci hladkého svalstva hrají vápenaté ionty. Za klidového stavu je extracelulární koncentrace Ca^{2+} 10^{-3} mol/l a intracelulární 10^{-7} mol/l (tzn. v cytosolu je až 10 000x menší koncentrace Ca^{2+}) (Lüllmann et al. 2002). Aby mohlo dojít ke kontrakci hladké svaloviny, musí nejdříve dojít k nárůstu koncentrace vápenatých iontů v intracelulárním prostoru buňky. Do cytosolu proudí Ca^{2+} především z extracelulárního prostoru přes L-typ vápníkových kanálů. Zároveň také ze sarkoplazmatického retikula (SR), ale jeho podíl na zvýšení nitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} je menší (Kittnar 2011, Lüllmann et al. 2002). Na řízení intracelulární koncentrace se podílí regulační proteiny kalmodulin, kaldesmon a kalponin (Kittnar 2011).

Po zvýšení intracelulární koncentrace se vápníkové ionty váží na kalmodulin. Vzniká komplex vápník-kalmodulin, který aktivuje lehkotěžcovou myozinkinázu

(MLCK). MLCK umožní vytvořit vazebné můstky mezi aktinem a myozinem tím, že fosforyluje myozinové řetězce. Interakcí myozinu s aktinem vzniká kontrakce. Zdrojem energie pro kontrakci je adenosintrifosfát (ATP) (Lüllmann et al. 2002, Silbernagl a Despopulos 2009).

Po snížení Ca^{2+} koncentrace se vápenaté ionty z komplexu s kalmodulinem uvolňují, tím je umožněno odštěpování fosfátu z lehkých řetězců myozinu (MLC) pomocí lehkoreťezcové myozinfosfatázy (MP). To zabrání další interakci aktinu s myozinem a nastává relaxace. Působení MP je ukončeno prostřednictvím Rho-kinázy (inaktivuje MP fosforylací) (Obr. 3) (Lincoln et al. 2001, Kittnar 2011).

Rychlost kontrakce je dána rychlostí vzniku a zániku aktin-myozinových můstků, která je mnohem menší než u příčně pruhované kosterní svaloviny (Kittnar 2011). Hladká svalovina tak zprostředkovává sice pomalé stahy, avšak mohutné a neunavitelné (Balko et al. 2017).



Obr. 3 kontrakce hladkého svalu na molekulární úrovni

Upraveno podle: Klabunde (2021), Dostupné na URL: <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP026>. Přístup: 21. 7. 2021

3.3. Mechanismy regulace tonu cévního svalstva

Pro správné fungování krevního oběhu je nutné zajistit perfuzi jednotlivých tkání a orgánů. Požadavky na prokrvení se však v různých místech a v různých momentech značně liší. Zároveň je potřeba zajistit nepřetržitý tok krve správným směrem, a tím v oběhu udržet minutový srdeční výdej a tlakový gradient. Pro zabezpečení těchto potřeb se vyvinuly rozličné řídicí mechanismy. Můžeme je rozdělit na mechanismy lokální (místní) a centrální (celkové) (Kittnar 2011, Petřek 2019).

Lokální regulační mechanismy, někdy též označované jako autoregulace, mají vliv pouze na jediný orgán. Udržují průtok krve jednotlivými tkáněmi a orgány konstantní a stále stejně rychlý i při změně krevního tlaku (TK). Zároveň průtok přizpůsobují metabolické aktivitě dané tkáně.

Centrální regulační mechanismy ovlivňují celou cirkulaci. Jsou řízeny z vazomotorického centra v mozkovém kmeni. Upravují srdeční činnost a průsvit cév tak, aby byl udržován stálý arteriální tlak krve a zachován tlakový gradient potřebný pro udržení krevního toku v cévách (Kittnar 2011, Petřek 2019).

Oba typy regulačních mechanismů existují ve všech tkáních, kde spolu úzce spolupracují. Avšak jejich význam se v různých tkáních liší. Lokální řízení dominuje zejména v myokardu a v mozku. Centrální řízení je typické spíše pro kůži či splachnickou oblast (Kittnar 2011, Petřek 2019).

Lokální řídicí mechanismy zahrnují endotelovou a enzymatickou regulaci. Do centrálních spadá hormonálně-neurogení regulace (která může zprostředkovávat i lokální řízení) (Kittnar 2011).

3.3.1. Lokální mechanismy

3.3.1.1. Endotelová regulace

Endotel disponuje fyzikální a parakrinní funkcí. Díky fyzikálnímu antitrombotickému působení zabraňuje tvorbě trombů a podporuje fibrinolýzu. Parakrinní působení spočívá v tvorbě a sekreci vasokonstrikčních působků, například endotelinu a vasodilatačních působků jako jsou prostaglandiny a oxid

dusnatý (NO). Dále se podílí na formování struktury cévní stěny a novotvorbě cév (Kittnar 2011, Púzserová 2016).

3.3.1.1.1. Endotelin

Existují tři isoformy endotelinu (ET). První byl popsán ET-1 a dále dva, jemu podobné, peptidy – ET-2 a ET-3. ET jsou v lidském těle široce distribuovány. K sekreci ET-1 dochází především v cévním endotelu, endometriu a centrálním nervovém systému (CNS), ET-2 je produkován ve střevě a ledvinách a ET-3 například v mozku, gastrointestinálním traktu (GIT) a plicích. ET se nacházejí i v krvi, ale vzhledem k tomu, že působí hlavně lokálně, jsou v krvi pouze v nízké koncentraci (Katzung 2018).

V lidském těle pro ně existují dva podtypy receptorů G-proteinového typu, ET_A a ET_B. ET_A receptory jsou umístěny na buňkách hladkého svalu, kde způsobují vasokonstrikci. Největší afinitu k ET_A má ET-1. Receptory ET_B mohou být umístěny v endotelu cév, kde zprostředkovávají uvolnění NO a PGI₂, a tím vyvolávají vasodilataci. Dále mohou být ET_B receptory lokalizovány v buňkách hladkého cévního svalu, kde naopak vedou k vasokonstrikci. Afinitu k ET_B má ET-1 i ET-3, oba přibližně stejnou (Katzung 2018, Schiffrin 2005).

Vasokonstrikční mechanismus endotelinu probíhá následovně: díky stimulaci Gq-receptoru dochází přes sekundární posly, zejména IP₃ (inositoltrifosfát), k uvolnění Ca²⁺ ze sarkoplazmatického retikula. Tím se následně přemění MLCK na svou aktivní formu aMLCK, jež fosforyluje myozinové řetězce, čímž umožňuje tvorbu můstků mezi aktinem a myozinem a následně vasokonstrikci. Zároveň se aktivuje Rho-kináza, která fosforyluje MP, čímž ji inaktivuje. MP defosforyluje lehké myozinové řetězce a tím působí relaxaci, její inhibice tak vede k zesílení vasokonstrikce (Houde et al. 2016, Takeya et al. 2015, Horinouchi et al. 2013).

3.3.1.1.2. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý, označovaný také jako endoteliální relaxační faktor (EDRF), je plynná signální molekula, která hraje hlavní roli ve vasodilataci zejména velkých cév (Rokyta 2000, Katzung 2018).

Je syntetizován z aminokyseliny L-argininu pomocí syntázy oxidu dusnatého (NOS). Existují tři izoformy NOS. Dvě konstitutivní formy – endotelová NOS

(eNOS) a neuronální NOS (nNOS) a jedna forma indukibilní NOS (iNOS). Aby mohlo dojít k syntéze, musejí být konstitutivní formy nejprve aktivovány vazbou Ca^{2+} na kalmodulin, indukibilní forma již je aktivovaná (Rokyta 2000, Katzung 2018). nNOS je exprimována v centrálním a periferním nervovém systému, přispívá k regulaci krevního tlaku a dilataci hladké svaloviny. iNOS exprimuje několik typů buněk, generuje velké množství NO, který se poté podílí na vzniku zánětlivých onemocnění. V endotelu je exprimována především eNOS, která má vasoprotektivní a anti-aterosklerotické účinky a hraje důležitou roli v regulaci cévního tonu a krevního tlaku (Lenasi 2018). Působením některých mediátorů, jako například bradykininu či acetylcholinu (Ach) dochází k uvolňování NO z buněk endotelu. Ten poté snadno difunduje z buněk, ve kterých vznikl, přes buněčnou membránu do okolních buněk hladkého svalů (Alberts 1998, Rokyta 2000).

Tam se váže na solubilní formu guanylátcyklázy (sGC), aktivuje jí, což vede k nárůstu koncentrace cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) z guanosintrifosfátu (GTP), který následně aktivuje proteinkinázu G (PKG). PKG aktivuje ATPázu SERCA a tím stimuluje vychytávání cytoplazmatického Ca^{2+} do sarkoplazmatického retikula a blokuje působení Rho-kinázy, což vede k defosforylaci MP a dochází k vasodilataci (Rokyta 2000, Lincoln et al. 2001, Adachi et al. 2004).

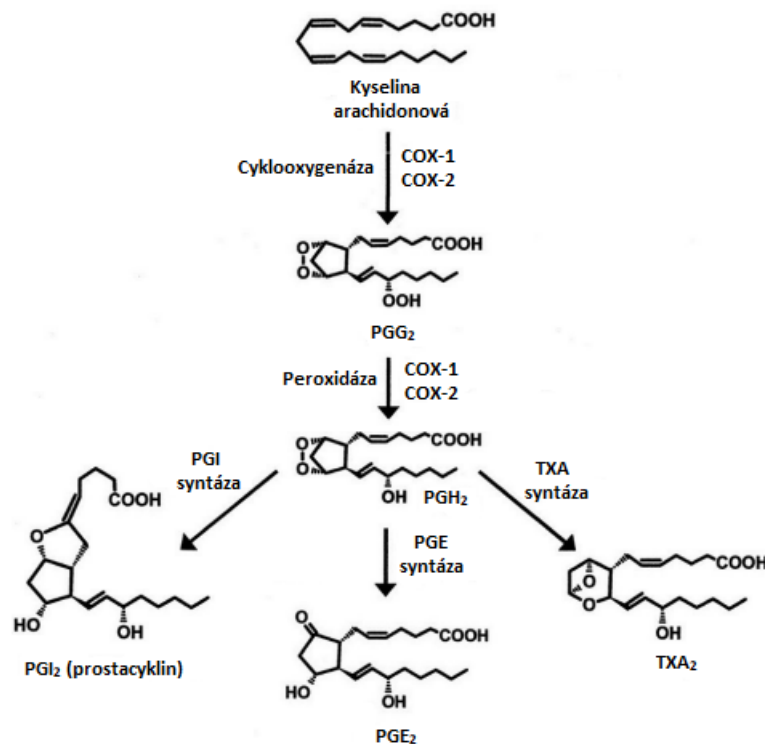
K vasodilataci vlivem NO může dojít i nezávisle na cGMP: 1) aktivací K^{+} - kanálů oxidem dusnatým, jež vede k efluxu draslíkových iontů a hyperpolarizaci membrány a následně k relaxaci; a dále také 2) přímou aktivací ATPázy SERCA (Lincoln et al. 2001, Púzserová 2016, Adachi et al. 2004).

Mimoto, že NO působí vasodilatačně a ovlivňuje tak krevní tlak, působí také antitrombotickým účinkem a má antimitotický vliv na hladkosvalové buňky (Stotz et al. 2004, Katzung 2018).

3.3.1.1.3. Prostanoidy

Spolu s leukotrieny je řadíme do skupiny eikosanoidů, jejichž prekurzorem je kyselina arachidonová (AA). Prostanoidy můžeme rozdělit na prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany.

Ke vzniku prostanoidů z AA dochází působením cyklooxygenázy (COX). Endotel exprimuje dva druhy cyklooxygenázy – COX-1 a COX-2. Převážně exprimuje COX-1, ale oba enzymy jsou z hlediska produkce prostanoidů esenciální. Působením COX-1 či COX-2 vzniká z AA nejprve prostaglandin G₂ (PGG₂), který je následně modifikován pomocí peroxidázy na prostaglandin H₂ (PGH₂). Oba tyto produkty jsou vysoce nestabilní a působením izomeráz a syntáz vzniká z PGH₂ prostaglandin E₂ (PGE₂), prostacyklin (PGI₂) a tromboxan A₂ (TXA₂) (Obr. 4) (Simmons et al. 2004, Katzung 2018).



Obr. 4 Syntéza prostaglandinů ve vaskulárním systému

Upraveno podle: Simmons et al. (2004) a Katzung (2018)

PGE₂ a PGI₂ jsou syntetizovány endotelovými buňkami. Hlavní prostanoid tvořený endotelem je PGI₂, který vazbou na IP receptor spojený s Gs-proteinem zprostředkovává vasodilataci a inhibuje agregaci krevních destiček – působí antitromboticky. PGE₂ je produkován endotelovými buňkami hlavně malých cév, jeho vasodilatační účinky se projevují po vazbě na EP₂ receptor, který je též spojený s Gs-proteinem (Simmons et al. 2004).

TXA₂ je tvořen krevními destičkami. Váže se na TP receptor na hladkém svaly, který je spojený s Gq-proteinem a má naopak vasokonstriční a proagregační účinky (navíc zesiluje účinky jiných, silnějších agonistů destiček, jako například trombinu) (Simmons et al. 2004, Katzung 2018). V roce 2006 bylo překvapivě zjištěno, že TXA₂ může vznikat i v buňkách endotelu (Gluais et al. 2006).

K relaxaci hladkého cévního svaly dochází přes receptory spojené s Gs-proteinem (receptory EP₂ a IP). Nejprve dojde k aktivaci adenylátcyklázy. To vede ke zvýšení intracelulární koncentrace cAMP, tím se následně aktivuje proteinkináza A (PKA). PKA fosforyluje lehkotěžcovou myozinkinázu. MLCK je tak deaktivována a nemůže dojít k interakci mezi aktinem a myozinem, která by vedla k vasokonstrikci. PKA též blokuje uvolňování Ca²⁺ ze sarkoplazmatického retikula a naopak zvyšuje jeho vychytávání pomocí SERCA. Kromě toho aktivuje eflux K⁺, čímž vede k hyperpolarizaci buňky hladkého svaly a vasodilataci (Masterson et al. 2011, Katzung 2018, Brunton et al. 2011).

Naopak v signalizační kaskádě TXA₂ dochází po vazbě na TP receptor (Gq-typ) ke zvýšení koncentrace intracelulárních Ca²⁺ iontů a aktivaci proteinkinázy C. Následuje vasokonstrikce, která usnadňuje agregaci krevních destiček a biosyntézu dalšího TXA₂ (Katzung 2018).

Kromě účinků na hladkou svalovinu mají prostanoidy vliv například na ledviny, kde hrají důležitou roli při udržování krevního tlaku. PGE₂ a PGI₂ totiž regulují vylučování vody a sodíku a lokálně udržují průtok krve ledvinami svým vasodilatačním působením. TXA₂ způsobuje intrarenální vasokonstrikci. Dále se PGE₂ a PGI₂ podílejí například na zánětlivých reakcích. Zvyšují cévní permeabilitu, tvorbu otoků a podporují průtok krve v zanícené oblasti. PGI₂ a vysoké koncentrace PGE₂ způsobují uvolnění děložního svaly, zatímco TXA₂ a nízké koncentrace PGE₂ ho stahují. Prostaglandiny E inhibují sekreci žaludeční kyseliny a působí cytoprotektivně, v GIT se tak projevuje jejich ochranný účinek proti peptickým vředům (Katzung 2018).

3.3.1.2. Enzymatická regulace

3.3.1.2.1. Renin-angiotensin-aldosteronový systém

Renin-angiotensin-aldosteronový systém (RAAS) je jedním z klíčových regulátorů homeostázy organismu (zajišťuje např. regulaci krevního tlaku, objemu tekutin a rovnováhy sodíku a draslíku). Může působit lokálně v tkáních nebo systémově prostřednictvím transportu svých složek krví (Muñoz-Durango et al. 2016, Durante et al. 2012).

K aktivaci RAAS vede uvolnění reninu ze specializovaných ledvinových buněk (juxtaglomerulárních buněk) do cirkulace. Podnětem k uvolnění reninu mohou být následující situace (Shier et al. 2007, Muñoz-Durango et al. 2016):

Prvním podnětem kontrolujícím uvolňování reninu je změna reabsorpce NaCl v *macula densa*, která vede k přenosu chemických signálů, jež modifikují uvolňování reninu. Při zvýšeném toku NaCl přes *macula densa* je sekrece reninu inhibována. Naopak při sníženém toku NaCl je jeho sekrece stimulována (Durante et al. 2012).

Druhou situací vedoucí k uvolnění reninu je snížení renálního perfúzního tlaku ve *vas afferens*, které je detekováno pomocí baroreceptorů (Durante et al. 2012, Lüllmann et al. 2002).

Posledním stavem podněcujícím sekreci reninu je stimulace sympatických nervů, a to přímou aktivací β_1 -receptorů nacházejících se na juxtaglomerulárních buňkách (Durante et al. 2012).

Renin je enzym, který odštěpuje decapeptid angiotensin I z angiotensinogenu. Angiotensin I je biologicky neúčinný a musí být dále přeměněn pomocí angiotensin konvertujícího enzymu (ACE) na oktapeptid – angiotensin II. ACE neštěpí specificky pouze angiotensin I, nýbrž také bradykinin, který štěpením inaktivuje (v souvislosti s bradykininem se někdy označuje jako „kinináza II“) (Lüllmann et al. 2002). ACE je přítomný v různých tkáních, např. v plicích, cévním endotelu či srdci. Kromě ACE může angiotensin II vznikat ještě působením dalšího enzymu – chymázy (Shier et al. 2007, Lüllmann et al. 2002).

Angiotensin II se váže na své receptory AT1 a AT2 (u člověka se vyskytují především AT1-receptory, AT2 se nacházejí např. u potkana, v lidském mozku,

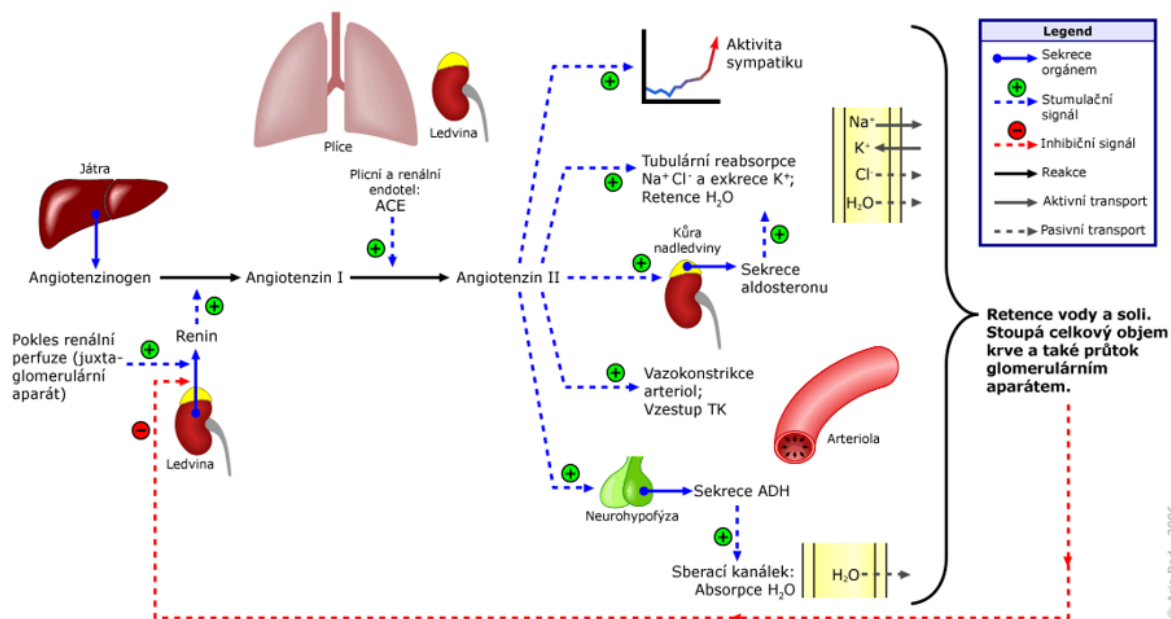
v lidských ledvinách, kde se uplatní při regulaci homeostázy sodných iontů, ve fetální či onemocnělé tkáni) (Lüllmann et al. 2002, Siragy 2010).

Vazbou na hladkosvalové AT1-receptory (Gq-tyt) zprostředkovává řadu účinků: v arteriálním řečišti vede k přímé vasokonstrikci a zvyšuje periferní odpor. Zvyšuje tonus také ve venózním řečišti, čímž se může zvýšit žilní návrat do srdce. Dále zvyšuje účinek sympatického nervového systému – na periférii usnadňuje synaptický přenos a centrálně zvětšuje tonus sympatiku. V neposlední řadě také podporuje sekreci aldosteronu z kůry nadledvin (Brunton et al. 2011, Durante et al. 2012, Lüllmann et al. 2002). Aldosteron zvyšuje zpětnou resorpci Na^+ i vody (osmotickým působením) a zvyšuje vylučování K^+ , důsledkem je větší objem cirkulující krve (Kittnar 2011, Shier et al. 2007). Tyto výše zmíněné účinky se podílejí na zvyšování krevního tlaku a RAAS je tak důležitou komponentou v jeho regulaci, a to v krátkodobém i dlouhodobém horizontu (Obr. 5) (Brunton et al. 2011, Lüllmann et al. 2002).

Mechanismus účinku přes AT1 receptory je spojen s aktivací fosfolipázy C (PLC). Následuje hydrolýza fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP_2) na IP_3 a diacylglycerol (DAG). IP_3 vazbou na své receptory v SR otevře kanál, který umožní eflux Ca^{2+} , DAG aktivuje proteinkinázu C (PKC) – následkem obou těchto dějů je vasokonstrikce (Durante et al 2012, Katzung 2018).

Receptor AT2 má podobnou strukturu i afinitu k angiotensinu II jako AT1 receptor. Naproti tomu však jeho stimulace způsobuje vasodilataci (ta může dokonce působit proti vasokonstrikci vyplývající ze stimulace AT1 receptorů). Vasodilatace navozená přes AT2 receptor je zřejmě závislá na oxidu dusnatém a dráze bradykininu zprostředkované přes B2-receptory (dráha přes B2R viz kapitola Kininový systém). Receptory AT2 se uplatní ve vybraných tkáních, např. v ledvinách, jinak v cévách obecně dominují receptory AT1 (Katzung 2018).

Při chronickém působení může angiotensin II přispívat k rozvoji hypertrofie srdeční i cévní svaloviny (Lüllmann et al. 2002).



Obr. 5 Schématické znázornění renin-angiotensin-aldosteronového systému

Převzato z: Nachtigal (2019)

3.3.1.2.2. Kininový systém

Kininový systém je složitý systém peptidů – kininů, jež vznikají ze svých prekurzorů kininogenů působením proteolytických enzymů označovaných jako kallikreiny (Katzung 2018, Moreau et al. 2005).

Mezi nejvýznamnější zástupce kininů řadíme bradykinin a Lys-bradykinin (kallidin). Kininy jsou rychle metabolizovány (poločas < 15 s) nespecifickými exo- i endopeptidázami, běžně nazývanými kininázy. Rozlišujeme kininázu I a kininázu II. Kinináza II je totožná s ACE a je považována za nejúčinnější. Nachází se v plazmě a cévních endoteliálních buňkách po celém těle, a jak již bylo zmíněno v kapitole RAAS, štěpí kromě bradykininu také angiotensin I (Katzung 2018).

Bradykinin má celou řadu účinků, například působí vasodilataci arterií, která se může projevit až poklesem TK a tachykardií. Vasodilatace je nejčastěji zprostředkovaná uvolněním NO či vasodilatačních prostaglandinů (PGE₂, PGI₂), jejichž tvorbu endotelem bradykinin podporuje. Méně obvyklé je přímé působení kininů na arteriolární hladkou svalovinu. Naproti tomu převládajícím účinkem na žíly je kontrakce, jež může plynout buď z přímé stimulace žilního hladkého svalstva nebo z uvolňování venokonstrikčních prostaglandinů (PGF_{2α}) (Katzung

2018, Trojan 2003). Bradykinin také podporuje žláзовou sekreci, senzibilizuje nociceptory a podílí se tak na vnímání bolesti. Dále zvyšuje permeabilitu cévní stěny a hraje roli při zánětech a edémech (Trojan 2003, Silbernagl a Lang 2001). Podporuje natriurézu a diurézu (Švihovec et al. 2018).

Tyto účinky se projevují po navázání bradykininu na příslušný receptor. Existují dva typy receptorů – B1 a B2, oba jsou spojené s G-proteinem.

B1 receptory mají velmi omezenou distribuci a pravděpodobně hrají roli při zánětu (Katzung 2018). Naproti tomu B2 receptory mají širokou distribuci, která je v souladu s množstvím účinků, jež tento receptor zprostředkovává. B2 receptor je spojený s Gq-proteinem (kaskáda IP₃ a DAG). V endoteliálních buňkách tak dochází přes PKC a zvýšení plazmatické koncentrace Ca²⁺ iontů k aktivaci eNOS a fosfolipázy A₂ (PLA₂). Následkem je tvorba oxidu dusnatého a prostacyklinu vedoucí k relaxaci hladkého svalů (Moreau et al. 2005, Katzung 2018).

3.3.2. Centrální mechanismy

3.3.2.1. Hormonálně – neurogení regulace

3.3.2.1.1. Autonomní nervový systém

Nervový systém je anatomicky rozdělen na centrální a periferní (PNS) nervový systém. PNS dále dělíme na somatický a autonomní (neboli vegetativní) nervový systém (ANS).

ANS funguje nezávisle, nepřetržitě a bez vědomého úsilí. Členíme ho na dvě hlavní větve – sympatikus (thorakolumbální větev) a parasympatikus (kraniosakrální větev) (Katzung 2018, Shier et al. 2007). Sympatikus je aktivován hlavně v situacích vyžadujících okamžitou reakci tzn. při stresu, energeticky náročné či nouzové situaci. Naopak parasympatikus je uplatňován spíše při klidovém tělesném stavu (Švihovec et al. 2018, Shier et al. 2007).

Oba systémy působí na organismus jako celek a vzájemně se doplňují. Společně inervují většinu orgánů, obvykle ovšem působí protichůdně – antagonisticky (zatímco jeden některé orgány aktivuje, druhý jejich funkci inhibuje). Avšak v některých orgánech může působit pouze jeden z nich (například v cévách se uplatňuje pouze sympatikus) (Švihovec et al. 2018, Shier et al. 2007). Oba se tak významně podílejí na regulaci funkce orgánů a tkání – regulují

činnost hladkých a srdečních svalů a žláz, řídí dechovou frekvenci, tělesnou teplotu, TK, srdeční tep a další viscerální aktivity, které přispívají k udržení homeostázy (Shier et al. 2007, Brunton et al. 2011).

Tento systém je řízen pomocí četných viscerálních receptorů, které nepřetržitě kontrolují stav organismu a pomocí aferentních vláken předávají signály do CNS. Z CNS jsou pak impulzy přenášeny zpět k efektorovým orgánům pomocí eferentních vláken (Trojan 2003, Shier et al. 2007). Za různé účinky jsou odpovědné různé mediátory ANS. Hlavním mediátorem sympatických postgangliových vláken je noradrenalin. Spolu s ním je z dřene nadledvinek uvolňován adrenalin. Tyto mediátory se vážou na adrenergní receptory. Mediátorem pregangliových i postgangliových parasympatických vláken a některých postgangliových sympatických vláken je acetylcholin, ten se váže na cholinergní receptory (Brunton et al. 2011, Katzung 2018, Shier et al. 2007).

3.3.2.1.2. Katecholaminy

Katecholaminy, mezi něž řadíme dopamin (D), noradrenalin a adrenalin (A), jsou tělu vlastní hormony vznikající syntézou z aminokyseliny tyrosinu (Trojan 2003, Brunton et al. 2011).

K prvnímu kroku jejich syntézy dochází v cytosolu. Jedná se o hydroxylaci tyrosinu za vzniku dihydroxyfenylalaninu (DOPA), který je dále dekarboxylován na dopamin. Dopamin musí být poté transportován do zásobních vezikul, kde je hydroxylován na noradrenalin. Posledním krokem syntézy je methylace noradrenalinu na adrenalin, tento krok probíhá v dřeni nadledvin (Brunton et al. 2011, Robertson et al. 2012, Jameson et al. 2010).

Adrenalin i noradrenalin jsou oba mediátory sympatického nervového systému. Obě látky jsou vylučovány nadledvinami jako hormony, ale pouze noradrenalin je uvolňován jako neurotransmitter sympatickým nervovým systémem (Shier et al. 2007). K uvolnění NA z vezikul presynaptického neuronu dochází při šíření akčního potenciálu, který navodí influx Ca^{2+} do cytoplazmy neuronu. Následuje fúze vezikul s presynaptickou membránou a uvolnění obsahu do synaptické štěrbině. NA difunduje synaptickou štěrbinou, váže se na příslušné receptory a vyvolává odpověď (Brunton et al. 2011).

Adrenalin vzniká pouze v dřeni nadledvin, kde je po vytvoření skladován. Při aktivaci sympatiku je exocytózou uvolňován do krevního oběhu, odkud putuje ke svým receptorům (Štejfá 2007, Kittnar 2011).

Receptory efektorových buněk, na něž se NA i A váží, se označují jako adrenergní (Shier et al. 2007).

Adrenergní receptory patří do skupiny metabotropních receptorů spojených s G-proteinem. Rozlišujeme dva hlavní typy adrenergních receptorů: alfa a beta, které dále dělíme na podtypy: alfa1, alfa2, beta1, beta2 a beta3 (Kittnar 2011, Katzung 2018).

α – receptory

α 1-receptory jsou lokalizovány na postsynaptických membránách efektorových orgánů, zejména v hladké svalovině (Švihovec et al. 2018). Jsou spojeny s Gq-proteinem. Jejich aktivace vede činností PLC k uvolnění IP_3 a DAG a následnému zvýšení intracelulárních Ca^{2+} iontů. Podílejí se na vasokonstrikci cév v kůži, sliznicích a GIT, na mydriáze, na stahu hladkého svalstva sfinkteru močového měchýře, prostaty a těhotné dělohy, ejakulaci a dalších (Švihovec et al. 2018, Brunton et al. 2011).

α 2-receptory se vyskytují na presynaptických i postsynaptických membránách v hladké svalovině, trombocytech a lipocytech (Švihovec et al. 2018, Brunton et al. 2011). Jsou spojeny s Gi-proteinem. Stimulace α 2-receptoru vede k inhibici adenylátcyklázy, čímž způsobuje pokles cAMP. Presynaptické receptory inhibují další výdej NA (tzv. negativní zpětná vazba). Postsynaptické receptory v CNS snižují aktivitu sympatiku a uvolňování jiných neurotransmiterů a periferní postsynaptické receptory vedou k vasokonstrikci (obdobně jako α 1-receptory) (Brunton et al. 2011, Švihovec et al. 2018, Katzung 2018).

β – receptory

Všechny β -receptory jsou spojeny s Gs-proteinem. Jejich stimulace vede k aktivaci adenylátcyklázy a následnému zvýšení cAMP. Zvýšená koncentrace cAMP vede k aktivaci proteinkinázy A (PKA), která se podílí na inaktivaci enzymu MLCK a relaxaci hladkého svalstva (Katzung 2018).

PKA je enzym podílející se na fosforylaci dalších enzymů, čímž mění jejich aktivitu. V myokardu tyto fosforylované proteiny mají vliv na zvýšení dostupnosti vápníku (např. přímá aktivace L-typu vápenatých kanálů anebo fosforylace fosfolambanu, která aktivuje SERCA), což vede k větší síle kontrakce – pozitivní inotropii (Katzung 2018, Lüllmann et al. 2002). Kromě toho jsou fosforylovány další důležité cíle, jako troponin I a K⁺ kanály, což přispívá k pozitivně chronotropnímu působení.

β 1-receptory jsou lokalizovány pouze postsynapticky u adrenergických nervů. Nacházejí se především v srdci. Mají pozitivně chronotropní, inotropní, bathmotropní a dromotropní účinky a stimulují vylučování reninu. Tyto účinky vedou ke zvýšení spotřeby kyslíku myokardem (Švihovec et al. 2018, Trojan 2003).

β 2-receptory jsou lokalizovány presynapticky, postsynapticky a také mimo adrenergické nervy. Najdeme je v hladké svalovině a v kardiomyocytech. Mezi účinky, které se projevují po jejich aktivaci, patří vasodilatace (především v kosterním svalstvu), bronchodilatace, tokolytický účinek, zvýšení glykemie, třes kosterní svaloviny, podílí se na zvýšeném přestupu K⁺ iontů do kosterního svalstva a způsobují tím hypokalemii. Presynapticky umístěné β 2-receptory stimulují další uvolnění NA (Brunton et al. 2011, Švihovec et al. 2018, Moratinos a Reverte 1993).

β 3-receptory se nacházejí zejména v tukové tkáni, kde vedou k lipolýze aktivací hormon-senzitivní lipázy. Vyskytují se též v kardiomyocytech. Mají vliv na termogenezi (Kittnar 2011, Švihovec et al. 2018). V porovnání s β 1 a β 2-receptorem k nim mají ligandy nižší afinitu (Lüllmann et al. 2002).

Přehled hlavních agonistů nejdůležitějších receptorů, které ovlivňují cévní systém:

Adrenalin

Adrenalin se váže na α i β -receptory. V malých dávkách stimuluje pouze β 2 a způsobuje pokles diastolického tlaku. V terapeutických dávkách přetrvává stimulace β 2 a zároveň se zvyšuje systolický TK aktivací β 1-receptorů. Ve vysokých dávkách stimuluje převážně α 1-receptory a dochází ke zvýšení

i diastolického TK (vasokonstrikce způsobená α_1 -receptory je vyvažována vasodilatací způsobenou β_2 -receptory) (Brunton et al. 2011, Katzung 2018, Štejfa 2007).

Noradrenalin

Noradrenalin je silným stimulatorem hlavně α -receptorů, mnohem menší afinitu má k β_1 a β_2 -receptory nestimuluje vůbec. Jeho působením se zvyšuje systolický i diastolický TK a snižuje se prokrvení ledvin. V cévách vyvolává vasokonstrikci (vasodilataci vyvolat nemůže, jelikož nestimuluje β_2). Působení NA může reflexně převážit vagová stimulace vedoucí k bradykardii (Brunton et al. 2011, Švihovec et al. 2018, Štejfa 2007).

Dopamin

Dopamin je prekurzorem NA a A. Slouží jako neurotransmiter především v CNS, jeho receptory se ale nacházejí i na periférii – například v adrenergních zakončení neuronů renálních a mesenterických cév (Katzung 2018, Tayebati et al. 2011).

Existuje 5 typů dopaminových receptorů (D1 – D5 receptor), které spadají do dvou kategorií: D1-like (D1, D5) a D2-like skupina (D2, D3, D4). Všechny jsou metabotropní, spřaženy s G-proteinem (Katzung 2018).

D1-like receptory jsou typicky spojeny se stimulací adenylátcyklázy a zvýšením cAMP, čímž vedou k relaxaci hladké svaloviny. D2-like receptory naopak inhibicí adenylátcyklázy snižují cAMP, jsou inhibované vápníkové kanály, a naopak otevřené draslíkové kanály (Katzung 2018).

Již v malých dávkách stimuluje dopamin na periférii D1 receptory a vyvolává tak vasodilataci (hlavně v renální, koronární a mesenterické oblasti). Zvyšuje prokrvení ledvin, glomerulární filtraci a exkreci sodíku. Kromě dopaminových receptorů je schopen ve vyšších dávkách obsazovat také β_1 -receptory, tím vzrůstá srdeční frekvence a systolický TK (diastolický TK a periferní odpor se nemění). Ve vysokých dávkách dokáže aktivovat α_1 a vyvolat tak vasokonstrikci a zvýšit TK (renální vasodilatace může zůstat zachovaná) (Brunton et al. 2011, Švihovec et al. 2018, Štejfa 2007).

Nástup účinku endogenních katecholaminů je rychlý, ale vzhledem k rychlé degradaci působí pouze krátkodobě (2-5 min). K ukončení jejich působení dochází těmito způsoby: (Brunton et al. 2011, Švihovec et al. 2018)

1. Reuptake – u noradrenalinu může docházet k reuptaku pomocí norepinefrinového transportéru (NET) (Katzung 2018). NA je touto cestou přijímán zpět do vezikul presynaptického neuronu (neuronální příjem, uptake 1). Či pomocí extraneuronálního monoaminového transportéru (EMT), jímž může být NA přijímán do postsynaptické tkáně (extraneuronální příjem, uptake 2) (Brunton et al. 2011, Gründemann et al. 2002, Katzung 2018).

2. Outflow – katecholaminy mohou difundovat ze synaptické štěrbiny (Brunton et al. 2011).

3. Enzymatická degradace – katecholaminy mohou být štěpeny buďto katechol-O-methyltransferázou (COMT) nebo monoaminoxidázou (MAO). COMT se podílí na metabolismu katecholaminů, které byly přijaté do extraneuronálních tkání, v synaptických nervových zakončeních nebyla přítomnost tohoto enzymu prokázána. MAO způsobuje oxidativní deaminaci katecholaminů. Existují 2 isoformy – MAO A a MAO B (Brunton et al. 2011, Geha et al. 2001, Rang et al. 2012).

3.3.2.1.3. Acetylcholin

Dalším významným neuromediátorem je acetylcholin. Přenáší vzruchy v CNS a také v ANS (Silbernagl a Despopulos 2009).

Působí na synapsích všech pregangliových vláken sympatiku i parasympatiku, všech postgangliových vlákních parasympatiku a některých postgangliových vlákních sympatiku (Brunton et al. 2011).

Syntéza acetylcholinu probíhá v cytoplazmě nervových zakončení z cholinu a acetylkoenzymu A působením enzymu cholinacetyltransferázy. Poté je acetylcholin uskladněn ve vezikulech (Katzung 2018, Silbernagl a Despopulos 2009).

K uvolnění z vezikul dochází po vzniku akčního potenciálu (AP). AP se šíří a vede k depolarizaci. Odpovědí na depolarizaci je influx Ca^{2+} do cytoplazmy. Následuje

fúze vezikul s membránou a uvolnění acetylcholinu do synaptické štěrbině. Poté se může navázat na postsynaptické receptory a vyvolat účinek. AP je rychle ukončen odbouráním acetylcholinu v synaptické štěrbině působením acetylcholinesterázy (Brunton et al. 2011, Silbernagl a Despopulos 2009).

Acetylcholin se váže na cholinergní receptory – muskarinové a nikotinové.

Muskarinové receptory se nacházejí na efektech parasympatiku a potních žlázách sympatiku. Rozlišujeme 5 typů muskarinových receptorů, všechny jsou spojené s G-proteinem. M₁ receptory se nachází v CNS, autonomních gangliích (kde modulují nikotinové účinky) a parietálních buňkách, působí excitačně. M₂ receptory se vyskytují v srdci, jsou spojeny s Gi-proteinem a působí inhibičně – negativně chronotropně a dromotropně. M₃ receptory jsou typu Gq a vyskytují se ve žlázách, kde působí stimulačně, a také v cévách. Tam jejich účinek závisí na tom, zda jsou umístěny v endotelu anebo přímo na hladkém svaly. V případě přítomnosti funkčního endotelu navodí relaxaci hladké svaloviny aktivací Ca²⁺-dependentní NO syntázy a vznikem NO. Přímo v hladké svalovině cév vyvolávají naopak kontrakci (Brunton et al. 2011, Silbernagl a Despopulos 2009).

Nikotinové receptory můžeme též rozdělit na více typů. Existují nikotinové svalové receptory (N_m), přítomné v nervosvalové ploténce a nikotinové neuronální receptory (N_n), přítomné ve vegetativních gangliích a dřeni nadledvin. Jedná se o inotropní receptory, tzn. spřažené s iontovými kanály, jejich stimulace je rychlá a vede ke zvýšení permeability pro Na⁺ a Ca²⁺ ionty (Brunton et al. 2011, Silbernagl a Despopulos 2009).

3.3.2.1.4. Serotonin

Další látkou ovlivňující hladký cévní sval je serotonin neboli 5-hydroxytryptamin (5-HT). Serotonin je syntetizován z aminokyseliny L-tryptofanu, poté je buď skladován ve vezikulech nebo rychle inaktivován monoaminoxidázou (Katzung 2018).

Kromě CNS se tvoří i v enterochromafinních buňkách střeva, trombocytech a dalších buňkách a zastává tak několik rolí – působí jako důležitý neurotransmitter, lokální hormon ve střevě, jako složka v procesu agregace krevních destiček a dále například jako prekurzor melatoninu. Podílí se tak

na regulaci několika fyziologických funkcí jako je chuť k jídlu, vnímání bolesti, regulace tonu hladké svaloviny cév a krevního tlaku, termoregulace, zvracení, spánek a nálada. Rovněž má vliv na stavy jako je úzkost či migréna (Silbernagl a Lang 2001, Katzung 2018).

Účinky serotoninu se projeví po navázání na serotoninové receptory. Bylo identifikováno 7 typů 5-HT₁₋₇ receptorů, z nichž 6 je spojeno s G-proteinem, zbylý receptor (konkrétně 5-HT₃) vystupuje jako ligandem řízený iontový kanál (Katzung 2018).

V závislosti na typu receptoru může serotonin navozovat vasokonstrikci i vasodilataci. Vasokonstrikci hladkého svalstva může navodit buď přímo – stimulací 5-HT₂ receptorů (Gq) ve velkých cévách a stimulací 5-HT₁ receptorů (Gi) v mozkových cévách. Nebo prostřednictvím aktivace dalších mediátorů jako jsou katecholaminy či prostaglandiny (Silbernagl a Lang 2001, Villalón a Centurión 2007). K vasodilataci v odporových cévách dochází prostřednictvím endoteliálních 5-HT₂ receptorů (ale pouze za velmi nízkých koncentrací serotoninu, *ex vivo* < ~1 nM) anebo 5-HT₇ receptorů (Gs) (Villalón a Centurión 2007, Migkos et al. 2020).

3.3.2.1.5. Vazopresin

Vazopresin neboli antidiuretický hormon (ADH) je nonapeptid, vznikající v hypotalamu stimulací osmoreceptorů. Důležitým regulačním faktorem jeho tvorby a uvolňování je osmolalita krevní plazmy. Při vzestupu osmolality zvyšují osmoreceptory syntézu ADH a zároveň vydávají stimuly k jeho sekreci v neurohypofýze, při poklesu osmolality se jeho sekrece naopak snižuje (Trojan 2003, Katzung 2018).

Váže se na dva typy tzv. vazopresinových receptorů (V1 a V2) a zprostředkovává tak dva různé účinky – vasokonstrikční a antidiuretický (Shier et al. 2007, Lüllmann et al. 2002).

Vasokonstrikční efekt zprostředkovávají vysoké koncentrace ADH vazbou na V1 receptory, jež jsou spřaženy s Gq-proteinem (Jabor et al. 2018, Silbernagl a Lang et al. 2001). Po vazbě na V1 receptor se zvýší koncentrace inositoltrifosfátu, který vede ke zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů, což následně

způsobí kontrakci hladkých svalových buněk cév, především menších arterií a arteriol (Shier et al. 2007, Konrádová et al. 2000).

Na antidiuretickém účinku se podílejí receptory V2 (Lüllmann et al. 2002). V momentě, kdy se vazopresin naváže na receptor V2, který se nachází na intersticiální straně epitelálních buněk sběracích tubulů, dojde ke zvýšení tvorby cAMP. Tím je umožněna inkorporace kanálových proteinů pro vodu, tzv. akvaporinů, do luminální membrány buněk. Zvýšení počtu akvaporinů v luminální membráně následně vede ke zvýšení zpětné resorpce vody (Lüllmann et al. 2002, Trojan 2003).

Zvyšováním zpětné resorpce vody i vasokonstrikcí cév se vazopresin může podílet na zvyšování krevního tlaku (Trojan 2003, Konrádová et al. 2000). K pozorovatelnému zvýšení TK ovšem dochází až při vyšších dávkách ADH. Za fyziologických podmínek je produkován pouze v malém množství, které na TK příliš velký vliv nemá (Konrádová et al. 2000, Jabor et al. 2018). Jeho nedostatek vede ke vzniku *diabetes insipidus* (Katzung 2018).

3.3.2.1.6. Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy jsou látky složené z aminokyselin. Můžeme je rozdělit na několik strukturně blízkých peptidů: ANP (atriální natriuretický peptid), urodilatin (izoforma ANP), BNP (mozkový natriuretický peptid) a CNP (natriuretický peptid typu C) (Pudil a Tichý 2010).

ANP

ANP je syntetizován primárně v myokardu síní, méně pak v myokardu komor či neuronech CNS i PNS a v plicích (Katzung 2018, Pudil a Tichý 2010). Při syntéze se vytváří nejprve prepro-ANP, ze kterého po odštěpení signálního peptidu vznikne pro-ANP. Pro-ANP forma se dále štěpí na aktivní C-terminálu (vlastní ANP) a N-terminálu, která je neaktivní, ale stabilnější a má delší poločas (uplatňuje se tak při laboratorních stanoveních srdečního selhávání – SS). Vytvořený ANP je skladován v sekrečních granulích síní (Štejfa 2007, Pudil a Tichý 2010). Z granul se uvolňuje působením různých podnětů jako například stimulací α_{1A} adrenergických receptorů, endotelinu, glukokortikoidů apod. (Katzung

2018). Stimulem k dlouhodobému uvolňování je roztažení síní při zvýšení centrálního žilního tlaku (př.: hypervolemií při SS) (Štejfá 2007).

Po uvolnění ANP z granul do krve se projevují jeho účinky, mezi něž patří: inhibice uvolňování reninu a aldosteronu, snížení produkce vazopresinu, vasodilatace (dilatuje aferentní arterioly, ale kontrahuje eferentní arterioly), zlepšení koronárního průtoku, podpora natriurézy a diurézy a snížení arteriálního krevního tlaku. Při vysokých hladinách se však vasodilatační a natriuretický efekt otupuje. ANP má také antiproliferativní efekt, pomocí kterého příznivě ovlivňuje remodelaci myokardu (Štejfá 2007, Pudil a Tichý 2010).

BNP

Podobně jako ANP, je BNP syntetizován v srdci, především však v myokardu komor a nepatrně v síních. B v názvu (brain - mozkový) odráží, že byl prvně izolován z extraktu z prasečích mozků. Nejsilnějším stimulem pro uvolňování BNP je zvýšené napětí ve stěně myokardu způsobené objemovým či tlakovým přetížením, dalším stimulem může být ischemie (Pudil a Tichý 2010, Katzung 2018, Štejfá 2007).

Vykazuje natriuretické, diuretické a hypotenzní účinky podobné ANP, ale cirkuluje v nižší koncentraci. BNP může být s ANP spolu-vylučován (Katzung 2018).

CNP

CNP je lokalizován primárně v CNS, též se nachází v cévním endotelu či ledvinách. Má pouze malou natriuretickou a diuretickou aktivitu, ale je silný vasodilátor a hraje roli při regulaci cévního tonu a inhibuje proliferaci fibroblastů (Katzung 2018, Tichý a Pudil 2010). Jeho hladiny jsou zvýšeny při renálním selhání, ne při srdečním (Štejfá 2007).

Urodilatin

K syntéze urodilatinu dochází ve sběrných kanálcích ledvin (Štejfá 2007). Vyvolává silnou natriurézu a diurézu a uvolňuje hladké svalstvo (Katzung 2018).

Biologické působení natriuretických peptidů je zprostředkováno vazbou na specifické receptory (Katzung 2018). Rozlišujeme 2 druhy receptorů: signální

(NPR-A a NPR-B) a clearancový (NPR-C) (Pudil a Tichý 2010). Vazbou na NPR-A a NPR-B receptory dojde k aktivaci plazmatické guanylátcyklázy a následně ke zvýšení hladiny cGMP, což zapříčiní relaxaci hladkého svalstva v arteriolách i venulách (Madhani et al. 2003, Brunton et al. 2011, Katzung 2018). Ligandem pro NPR-A jsou ANP i BNP. Hlavním ligandem pro NPR-B receptor se i přes strukturní podobnost s NPR-A zdá být CNP. NPR-C je atypický receptor typu Gi, spojený s inhibicí adenylátcyklázy a s aktivací fosfolipázy C. Je schopný vázat všechny tři natriuretické peptidy (Katzung 2018, Rose a Giles 2008).

Z krevního oběhu mohou být natriuretické peptidy eliminovány 3 cestami: štěpením neutrální endopeptidázou (nejvýznamnější způsob), vazbou na receptory (především na clearancový) či ledvinou clearance (Pudil a Tichý 2010).

3.4. Flavonoidy

3.4.1. Charakteristika flavonoidů

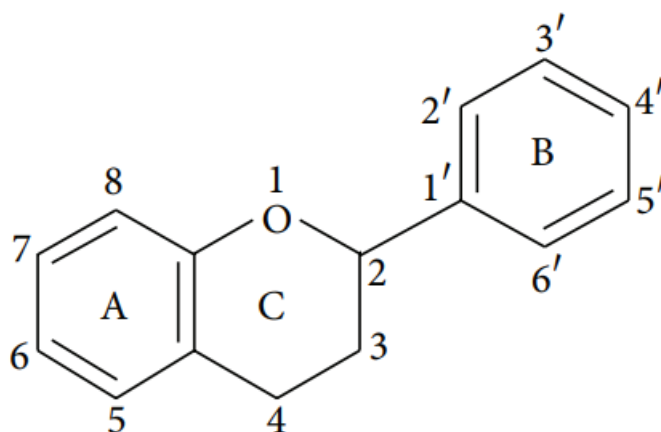
Flavonoidy tvoří velkou skupinu přirozeně se vyskytujících polyfenolických sloučenin. Dosud bylo identifikováno přes 4000 různých flavonoidů. Jsou hojně rozšířené po celé rostlinné říši, zejména v cévnatých rostlinách. V rostlinách se vyskytují většinou glykosidně vázané (jako O- nebo C-glykosidy), rozpuštěné v buněčné šťávě vakuol (Ajay et al. 2003, Spilková 2016, Viskupičová et al. 2008).

Tvoří nedílnou součást lidské stravy. Pravidelně jsou konzumovány hlavně v ovoci (např. citrusy, šípek, meruňka, hroznové víno, černý rybíz, borůvky) a zelenině (např. cibule, brokolice, rajče, špenát), dále také v ořeších, kakaových bobech a některých nápojích (červené víno, káva, čaj) (Najmanová et al. 2016, Viskupičová et al. 2008).

Epidemiologické studie prokázaly, že větší příjem ovoce a zeleniny má pozitivní dopad na lidské zdraví – snižuje riziko KVO, rakoviny a neurodegenerativních onemocnění. Tyto protektivní efekty ovoce a zeleniny jsou přičítány právě jejich fytochemickým komponentám – flavonoidům (Spencer a Crozier 2012, Viskupičová et al. 2008). Vysoký příjem flavonoidů je dokonce spojen s nižší celkovou mortalitou. Díky těmto skutečnostem se zvyšuje zájem o jejich výzkum (a to právě z dietárních zdrojů) (Kim a Je 2017, Yao et al. 2004).

3.4.2. Struktura a biosyntéza flavonoidů

Obecně jsou flavonoidy deriváty sloučeniny 2-fenylchromanu. Jsou složeny ze 2 benzenových kruhů označovaných jako A a B, spojených heterocyklickým pyranovým kruhem C (Obr. 6) (Yao et al. 2004, Kumar a Padney 2013).



Obr. 6 Flavonoidní skelet

Převzato z: Kumar a Padney (2013)

Biosyntéza flavonoidů vychází ze dvou hlavních cest: acetátové a šikimátové cesty (Spilková 2016). Jako primární prekurzor v obou těchto drahách vystupuje glukóza, z jejíhož metabolismu jsou odvozeny kyselina octová i šikimová (Wollgast a Anklam 2000, Formica a Regelson 1995).

V acetátové dráze vzniká z kyseliny octové nejprve její aktivní forma, acetyl CoA, který se následně metabolizuje na malonyl CoA, jež je výchozí látkou pro syntézu kruhu A flavonoidů (Wollgast a Anklam 2000, Formica a Regelson 1995).

Šikimátová dráha vede ke vzniku kruhů B a C. Nejdříve vzniká z metabolismu kyseliny šikimové fenylalanin (případně tyrosin), který je převeden na kyselinu skořicovou. Ta podléhá hydrolyze za vzniku kyseliny kumarové, z níž se dalšími transformacemi vytváří kumaroyl CoA (Wollgast a Anklam 2000, Vermerris a Nicholson 2008).

Za přítomnosti chalkonsyntázy kondenzují tři molekuly malonyl CoA s jednou molekulou kumaroyl CoA (Vermerris a Nicholson 2008). Touto kondenzací a následnou cyklizací vzniká 15ti uhlíkatý chalkon, který tvoří základní strukturu všech flavonoidů. Z chalkonu pak působením dalších enzymů (jako například izomeráz, reduktáz, hydroxyláz) vznikají jednotlivé druhy flavonoidů (Spilková 2016, Ferreyra et al. 2012).

Vzniklé flavonoidy jsou pak transportovány do vakuol a dalších intracelulárních i extracelulárních míst (Andersen a Markham 2006).

Všechny jsou tedy tvořeny charakteristickým uhlíkovým skeletem C₆-C₃-C₆ (difenylypropan), ale navzájem se jednotlivé flavonoidy (i jejich chemická povaha) liší počtem a orientací substituentů (př. methoxyl-, hydroxyl-) na obou aromatických kruzích, stupněm nasycení a druhem připojené cukerné složky či organické kyseliny (Spilková 2016, Kumar a Padney 2013, Ajay et al. 2003).

Mezi strukturou a aktivitou existují určité vztahy. Například methoxy skupiny zavádějí nepříznivé sterické účinky a zvyšují lipofilitu. Hydroxylové skupiny (nejčastěji v pozicích 3, 5, 7, 3', 4' a 5') zprostředkovávají antioxidační účinky odstraňováním volných radikálů nebo chelatací iontů kovů. Hydroxylové skupiny mohou být dále například metylovány, acylovány či sulfovány.

Nejtypičtějšími sacharidy jsou rhamnóza, glukóza, galaktóza a arabinóza (Kumar a Padney 2013, Heim et al. 2002, Viskupičová et al. 2008).

Podle stupně oxidace pyranového kruhu rozlišujeme několik skupin flavonoidů: flavony, flavanoly, flavanony, dihydroflavonoly, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly, chalkony, aurony a biogeneticky příbuzné isoflavonoidy a anthokyany.

Rozmanitost flavonoidních struktur přispívá k rozdílům v biologické účinnosti (odlišnosti ovlivňují biologickou dostupnost i bioaktivitu) (Spilková 2016, Cassidy a Minihane 2017).

3.4.3. Účinky flavonoidů

Flavonoidy jsou obecně netoxické a vzhledem k rozsáhlé škále účinků mají velmi široké terapeutické využití (Yao et al. 2004, Spilková 2016).

Mají několik pozitivních účinků na cévní systém. Zlepšují funkci endotelu, modulují cévní tonus, stabilizují cévní stěnu a zlepšují žilní a lymfatickou drenáž. Působí protizánětlivě a mají schopnost normalizovat permeabilitu kapilár a snižovat jejich fragilitu (Ajay et al. 2003, Vita 2005, Černožorská 2018). Mohou se proto využívat v terapii chronické žilní insuficience (Slonková 2017). Některé mohou rozšiřovat cévy a snižovat krevní tlak. Významná je jejich antioxidační aktivita a schopnost odstraňovat volné kyslíkové radikály a jiné reaktivní formy kyslíku z organismu. Flavonoidy jsou dokonce schopny inhibovat některé enzymy, které se účastní biochemických reakcí, při nichž vznikají volné radikály. Zabraňují tak oxidačnímu poškození při kardiovaskulárním či nádorovém

onemocnění a při stárnutí organismu (Spilková 2016). Odstraňováním radikálů mohou navíc bránit oxidaci LDL, jež se podílejí na vzniku aterosklerózy a hrají tak roli v její prevenci (Kim a Je 2017, Mahmoud et al. 2019).

Díky antiagregačnímu působení snižují riziko tvorby sraženin. Vykazují také účinky antihemoragické a antiedematozní (někdy označováno jako „P-vitaminový“ efekt). Chelatují železo a měď (Kim a Je 2017, Spilková 2016).

Mohou zvyšovat senzitivitu na insulin a vykazovat antidiabetické účinky. Dále inhibují hyaluronidázu a zabraňují šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi. Potencují účinek vitamínu C, mají antivirové účinky a nachází tak využití při léčbě infekčních onemocnění. Některé podporují tvorbu a vylučování žluči, působí spasmolyticky, hepato– a gastroprotektivně a mohou zvyšovat diurézu (Spilková 2016, Spencer a Crozier 2012, Yao et al. 2004).

3.4.4. Metabolismus flavonoidů

V potravě jsou flavonoidy přítomny převážně ve formě glykosidů či aglykonů. Po požití dochází k jejich absorpci, při které hraje roli například charakter navázaného sacharidu či pozice různých substituentů. K absorpci může docházet jednak v tenkém střevě (spíše minoritně), ale zejména pak v tlustém střevě, kde jsou flavonoidy vystaveny působení mikrobioty.

Po střevním metabolismu a absorpci dochází k transportu flavonoidů portální žilou do jater, jež jsou hlavním orgánem zodpovědným za různé biotransformace vedoucí ke vzniku konjugovaných forem flavonoidů. K metabolismu však může docházet kromě jater i v GIT, ledvinách a některých dalších orgánech (Viskupičová et al. 2008, Cassidy a Minihane 2017).

Metabolismus zahrnuje fázi I a fázi II. Pro první fázi jsou typické reakce jako je oxidace, redukce či hydrolýza. V druhé fázi dochází ke konjugačním reakcím jako je sulfatace, glukuronidace nebo methylace se substráty z fáze I. Na konjugaci se podílejí příslušné enzymy – sulfotransferázy, glukuronidázy a methyltransferázy. Nejčastější je konjugace se sulfátem či kyselinou glukuronovou (Viskupičová et al. 2008, Cassidy a Minihane 2017).

Již dlouho se spekuluje o metabolismu probíhajícím v tlustém střevě, který významně přispívá k celkové transformaci flavonoidů nejen z potravy, ale také

metabolitů z I. a II. fáze, které byly vyloučeny zpět do střeva enterohepatální cirkulací (Cassidy a Minihane 2017).

Aktivita flavonoidů byla v minulosti většinou stanovována pouze pomocí *in vitro* nebo *ex vivo* testů, ve kterých tato transformace zprostředkovaná mikrobiotou nebyla zohledněna. Mezi biologickými účinky *in vitro* a *in vivo* je velký rozdíl, který je přisuzován přítomnosti metabolitů vznikajících působením střevní mikroflóry, a je proto důležité tento aspekt zohledňovat (Viskupičová et al. 2008).

Biotransformace mikroflórou v tlustém střevě probíhají následovně. Ve střevě mohou být flavonoidy degradovány enzymy mikroflóry. Tyto enzymy sloučeniny deglykosylují. Navíc samotné mikroby mohou způsobovat řadu dalších transformací včetně demethylace, oxidace či katabolismu látek na menší fragmenty například na malé fenolické kyseliny a další aromatické katabolity, které se pak mohou snadněji vstřebávat a vyvolávat farmakologické účinky (Cassidy a Minihane 2017, Najmanová et al. 2016).

Zdá se, že některé z těchto kolonických metabolitů mají dokonce vyšší biologickou aktivitu než původní sloučeniny (Najmanová et al. 2016).

Biokonverze v kolonu je však velmi variabilní a na metabolické procesy může mít vliv řada faktorů včetně pohlaví, věku, stravy, genotypu a etniky či chemické struktury samotného flavonoidu. K variabilitě též přispívá, že příjem flavonoidů velmi pravděpodobně mění složení a funkci střevního mikrobiomu, a naopak, mikroflóra zvyšuje metabolismus flavonoidů (Cassidy a Minihane 2017).

Stanovení přesných dávek, které je potřebné přijímat v prevenci či léčbě výše zmiňovaných onemocnění, je obtížné. Podílejí se na tom např. různé a poměrně těžko měřitelné množství flavonoidů přijímané potravou, jejich variabilní metabolismus a ne zcela pochopený mechanismus účinku (Spencer a Crozier 2012).

3.4.5. Katecholy

Mezi metabolity flavonoidů můžeme zařadit také katecholy (Pourová et al. 2018). Nejčastěji se nacházejí například v kávě, kakau, cukrové řepě či ovoci (Ostertag et al. 2011). *Feliciano et al. (2016)* prokázali, že až 22,4 % metabolitů polyfenolů v krevní plazmě tvoří právě katecholy. Tyto látky disponují například vasodilatačními účinky, podílí se na poklesu krevního tlaku a ve vysokých dávkách snižují také agregaci krevních destiček (Ostertag et al. 2011, Pourová et al. 2018).

Velmi potentním se zdá být například 4-methylkatechol (a jeho konjugáty), u něž byla prokázána přímá vasodilatační aktivita jak *in vivo*, tak *ex vivo*. Mechanismus účinku není zatím zcela objasněn (Pourová et al. 2018). Na základě experimentů, které jsme provedli, se jako slibná sloučenina jeví také 3-methoxykatechol. Avšak k ověření jeho bezpečnosti a potvrzení jeho vlastností *in vivo* musí být provedeny další experimenty.

4. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo otestovat vasodilatační účinky vybraných derivátů katecholu *ex vivo* na izolované aortě potkana a u nejučinnější látky následně ověřit možné mechanismy účinku.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Pokusná zvířata

Experimenty byly prováděny na laboratorních potkanech kmene Wistar. Jednalo se o normotenzní outbrední samce s hmotností 350 – 450 g. Potkani byli dodáni firmou Charles River (Německo) a poté chováni ve viváriu – vždy minimálně týden před zahájením pokusu, aby došlo k aklimatizaci. Vivárium je součástí Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a jsou v něm udržovány podmínky vhodné k chovu laboratorních zvířat, jako konstantní teplota 23 – 25 °C a střídání světla a tmy ve 12 hodinovém intervalu. Ve snaze zmírnit stres, jsou potkani v jednotlivých chovných nádobách v menších skupinách, mají neomezený přístup k pitné vodě a pravidelný přísun odpovídající peletizované potravy.

Samotné experimenty i veškerá manipulace se zvířaty probíhaly v souladu se Zákonem České národní rady č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

5.2. Použité vybavení

5.2.1. Přístroje a pomůcky

- Aparatura pro izolovanou tkáň *ex vivo* (Multi chambre tissue bath system), (Experimentia Ltb., Budapešť, Maďarsko) (viz Obr. 7)
- Force/Displacement transducer (Experimetria Ltd., Budapešť, Maďarsko)
- Termostat U1 (Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Dresden, Německo)
- Plynová láhev s pneumoxidem – směs 95 % O₂ a 5 % CO₂ (Linde gas, Česká republika)
- Počítač
- Vyhodnocovací software, S.P.E.L., Advanced Kymograph Software SOFT-03- KYMO (Experimentia Ltb., Budapešť, Maďarsko)
- Software GraphPad Prism 9
- Program Excel
- Laboratorní váhy (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Analytické váhy Explorer Analytical

- Třepačka IKA Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Německo)
- Operační stůl, operační nástroje – nůžky, peán, pinzety
- Injekční stříkačky, jehly
- Laboratorní sklo – kádinky, lžičky, mikropipety, odměrné válce, Petriho misky, tyčinky, zkumavky
- Další laboratorní pomůcky – buničitá vata, gáza, gumové rukavice, mikrozskumavky (typ Eppendorf), špičky a dentální nit



Obr. 7 Aparatura pro izolovanou tkáň ex vivo (Multi chambre tissue bath system) v laboratoři Farmaceutické fakulty UK (katedra farmakologie a toxikologie)

Převzato z: Vlastní fotografie

5.2.2. Chemikálie

Při experimentech jsme používali Krebsův roztok, rozpouštědla, látky ovlivňující hladký cévní sval, anestetickou látku, antikoagulans a 15 různých derivátů katecholu.

Krebsův živný roztok

Jako živné médium byl při experimentech používán izotonický Krebsův roztok o pH 7,4. Díky svým vlastnostem vytváří podmínky podobné vnitřnímu prostředí organismu. Při jeho přípravě se nejdříve naváží látky uvedené v Tab. 1 (kromě chloridu vápenatého) a rozpustí se v menším množství destilované vody. Chlorid vápenatý se naváží a rozpustí zvlášť, tímto předcházíme vysrážení slabě rozpustných vápenatých solí. Poté tyto roztoky smícháme a doplníme destilovanou vodou na požadovaný objem.

Tab. 1 Složení Krebsova roztoku

Název látky	Vzorec	MW (g/mol)	Koncen- trace (g/l)	Výrobce
Chlorid sodný p.a.	NaCl	58,44	5,54	Penta Chrudim, Česká republika
Chlorid draselný p.a.	KCl	74,55	0,35	Lachema Brno, Česká republika
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	CaCl ₂	110,99	0,28	Lachema Brno, Česká republika
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	NaHCO ₃	84,01	2,1	Penta Chrudim, Česká republika
Dihydrogenfosfo- rečnan draselný p.a.	KH ₂ PO ₄	136,09	0,16	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česká republika
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	MgSO ₄ .7H ₂ O	246,47	0,29	Lachema Brno, Česká republika
D – glukóza monohydrát p.a.	C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O	180,16	2,1	Penta Chrudim, Česká republika

Rozpouštědla, která byla použita při pokusech uvádí Tab. 2.

Tab. 2 Rozpouštědla

Název látky	Vzorec	MW	Výrobce
Dimethylsulfoxid	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	78,13	Sigma-Aldrich, Německo
Destilovaná voda	H_2O	18,02	Katedra biochemických věd, FaF UK HK, dle platného lékopisu
MiliQ voda	H_2O	18,02	Katedra biochemických věd, FaF UK HK, dle platného lékopisu

Tab. 3 Vasoaktivní látky

Název látky	Vzorec	MW	Výrobce
Noradrenalin bitartrát monohydrát p.a.	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	337,28	Sigma Aldrich, Německo
Acetylcholin jodid p.a.	$(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{I})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$	273,1	Sigma Aldrich, Německo
Nitroprusid sodný dihydrát p.a.	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	297,95	Sigma Aldrich, Německo
ODQ	$\text{C}_9\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2$	187,15	Sigma Aldrich, Německo
DT-3	$\text{C}_{152}\text{H}_{258}\text{N}_{52}\text{O}_{28}\text{S}$	3294,07	Sigma Aldrich, Německo
Rp-8-pCPT-cGMPS sodný	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_5\text{NaO}_6\text{PS}_2$	525,86	Tocris Bioscience, Velká Británie
Bay K8644	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$	356,30	Axon Medchem BV (Groningen, Netherlands)
Nifedipin	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$	346,335	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

Tab. 4 Připravené základní roztoky

Název látky	Rozpouštědlo	Koncentrace (mmol.l ⁻¹)	Následné ředění	Koncentrace v nádobkách (μmol.l ⁻¹)
ODQ	DMSO	10	miliQ voda	1
DT-3	DMSO	10	miliQ voda	1
Rp-8-pCPT- cGMPS	DMSO	10	miliQ voda	1
Bay K8644	DMSO	10	miliQ voda	0,001 – 10
Deriváty katecholu	DMSO	10	Krebsův roztok	0,1 – 100

V experimentech jsme používali jako rozpouštědlo dimethylsulfoxid, jež navozuje mírné vasodilatační účinky. Abychom mohli rozlišit, zda relaxaci cévy skutečně vyvolává testovaná látka, používali jsme ho jako kontrolní roztok (vždy v odpovídající koncentraci, v jaké byla rozpuštěná testovaná látka).

Tab. 5 Anestezie

Název látky	Vzorec	MW	Výrobce
Uretan	C ₃ H ₇ NO ₂	89,09	Sigma-Aldrich, Německo

Tab. 6 Antikoagulans

Název látky	Vzorec	MW	Výrobce
Heparin	C ₁₂ H ₁₉ NO ₂₀ S ₃	12 000-15 000	Zentiva, Česká republika

Tab. 7 Další látky

Název látky	Vzorec	MW	Výrobce
Chlorid draselný	KCl	74,55	Lachema Brno, Česká republika

Tab. 8 Testované deriváty katecholu

Název derivátu	Zkratka	MW	Výrobce
3-aminokatechol	3-AC	125,13	TRC Canada (Toronto, Ontario, Canada)
3-fluorokatechol	3-FC	128,1	TRC Canada (Toronto, Ontario, Canada)
3-methoxykatechol	3-MOC	140,14	Sigma-Aldrich (Sant-Louis, MO, USA)
3-methylkatechol	3-MC	124,14	TRC Canada (Toronto, Ontario, Canada)
3-isopropylkatechol	3-IPC	152,19	TRC Canada (Toronto, Ontario, Canada)
4-aminokatechol	4-AC	125,13	TRC Canada (Toronto, Ontario, Canada)
4-chloropyrokatechol	4-CIC	144,56	TRC Canada (Toronto, Ontario, Canada)
4-methylkatechol	4-MC	124,14	Sigma-Aldrich (Sant-Louis, MO, USA)
3,5-dichlorokatechol	3,5-DCC	179	Sigma-Aldrich (Sant-Louis, MO, USA)
4,5-dichlorokatechol	4,5-DCC	179	Sigma-Aldrich (Sant-Louis, MO, USA)
4-nitrokatechol	4-NC	155,11	Sigma-Aldrich (Sant-Louis, MO, USA)
4-fluorokatechol	4-FC	128,1	TRC Canada (Toronto, Ontario, Canada)
4-terc-butylkatechol	4-TBC	166,217	Sigma-Aldrich (Sant-Louis, MO, USA)
Pyrokatechol	PC	110,11	Sigma-Aldrich (Sant-Louis, MO, USA)
4-ethylkatechol	4-EC	138,16	TRC Canada (Toronto, Ontario, Canada)

5.3. Metodika

5.3.1. Průběh experimentu

Manipulace se zvířetem:

Zvíře jsme odebrali z chovné nádoby ve viváriu, zvážili ho a přenesli v samostatné nádobě do laboratoře. V laboratoři mu byla intraperitoneálně, pomocí injekční stříkačky s ostrou jehlou, aplikována anestetická látka – uretan. Dávka uretanu je závislá na hmotnosti zvířete, a proto se pro každého potkana přepočítává individuálně (Tab. 8). Podává se 1,2 g/kg uretanu o koncentraci 20g/100ml, jeho metabolity jsou toxické. Je důležité anestezii podat rychle a šetrně, abychom vpichem nezpůsobili bolest a zvíře tak nevystavovali většímu stresu (při nadměrném stresu by mohlo dojít ke zkreslení výsledků).

Tab. 9 Objem podávaného anestetika podle hmotnosti zvířete

Hmotnost zvířete (g)	350	375	400	425	450
Objem anestetika (ml)	2,1	2,25	2,4	2,55	2,7

Po několika minutách, kdy zvíře upadlo do hluboké anestezie, jsme ho umístili na operační stůl a zafixovali ho. Následně byl zvířeti intravenózně (do *vena saphena*) aplikován heparin, aby nedocházelo ke srážení krve a byl tak snadnější její odběr. Následně se provedl stříh kožní řasou a svaly od abdominální až po thorakální oblast. Po odejmutí orgánů a okolní tkáně se obnažil úsek hrudní a břišní aorty. K usmrcení zvířete došlo v důsledku vykrvení z břišní aorty (odebraná krev se využívala pro další výzkumné účely).

Izolace tkáně a správné umístění do aparatury:

Po vykrvení zvířete byl vyjmut hrudní úsek aorty a umístěn do předem připravené Petriho misky s Krebsovým roztokem. S aortou jsme museli při jakékoli manipulaci zacházet šetrně, abychom nepoškodili endotel. Aortu jsme kompletně očistili od okolní tkáně a zbytku krve a nastříhali na osm přibližně stejných segmentů o velikosti 3-4 mm. Aortální kroužky jsme jednotlivě navlékali vždy

mezi dva háčky z nerezové oceli. Jeden z háčků byl připevněn na pevný nosič a druhý byl pomocí chirurgické nitě spojen s převodníkem. Toto uspořádání umožňovalo převádět mechanickou energii na elektrickou, díky níž se na monitoru zobrazovaly signály, pomocí kterých bylo možné odečíst, zda docházelo k dilataci nebo konstrikci tkáně. Signály se zaznamenávaly ve vyhodnocovacím softwaru S.P.E.L. Advanced Kymograph Software.

Tkáň fixovanou na háčcích jsme ihned umístili do Schulerovy nádoby na izolovanou tkáň. Nádoby byly napuštěny 5ml Krebsova roztoku, který byl pomocí termostatu temperován na 37 °C, tedy teplotu těla (při jiné teplotě by mohlo dojít k termickému šoku a tkáň by se poničila). Zároveň byl živný roztok okysličován pneumoxidem.

Stabilizace a zátěž tkáně:

Před vlastním pokusem jsme nejprve stabilizovali tkáň. Pomocí otočných regulačních šroubů se aortální kroužky zatížily 2 g. Napětí tkáně jsme zvyšovali postupně, aby nedošlo k jejímu poškození (o 0,15 – 0,2 g přibližně po 30 vteřinách). Po dosažení hodnoty 2 g se kroužky nechaly stabilizovat po dobu 45 minut. Během stabilizace jsme obměňovali vždy po 10 minutách Krebsův roztok v měřících nádobkách.

Testování kontraktility a ověření integrity endotelu:

Před zahájením vlastního experimentu jsme otestovali kontraktilitu cévy a funkčnost endotelu. Pro navození kontrakce jsme do měřících nádobek s Krebsovým roztokem přidali 50 µl noradrenalinu (finální koncentrace v nádobkách byla 1 µmol.l⁻¹). Došlo ke kontrakci a odpověď jsme nechali ustálit (asi 30 minut). Pro ověření neporušenosti endotelu jsme následně do nádobek přidali 50 µl acetylcholinu (finální koncentrace 100 µmol.l⁻¹). O přítomnosti funkčního endotelu svědčila vasodilatace, do pokusu jsme zařadili vzorky relaxující nejméně z 40 %. Po otestování kontraktility a funkce endotelu jsme v nádobkách několikrát vyměnili Krebsův roztok, abychom vymyli přítomný noradrenalin a acetylcholin. Vzorky jsme nechali znovu stabilizovat až do dosažení základní zátěže (baseline) přibližně 1 g a ustálení hodnot. Nádoby jsme opět naplnili přesně 5 ml Krebsova roztoku. Poté byly vzorky připraveny na vlastní experiment.

Vlastní experiment:

Vlastní experiment spočíval buď ve screeningu vasodilatačních účinků derivátů katecholu nebo v testování mechanismu účinku pro nejúčinnější derivát ze screeningu, 3 – methoxykatechol.

1. Screening vasodilatačních účinků derivátů katecholu:

Experiment jsme zahájili přidáním noradrenalinu do všech nádobek (finální koncentrace $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a vyčkali, než dojde ke stabilizaci navozené kontrakce. Poté jsme do nádobek kumulativně přidávali derivát katecholu (Tab. 8) k navození vasodilatace. Každý derivát byl testován samostatně. Byl rozpuštěn v DMSO, vždy na koncentraci 10 mmol.l^{-1} a na potřebné koncentrace dále naředěn pomocí Krebsova roztoku. Při jednom pokusu byly deriváty testovány v šesti nádobkách. Zbylé dvě nádobky sloužily jako kontrolní, tzn. že jsme přidávali pouze vehikulum (roztok DMSO v Krebsově roztoku) v odpovídající koncentraci a objemu jako testované deriváty. Při testování derivátů jsme vždy začínali s nejnižší koncentrací, 100 nmol.l^{-1} , kterou jsme dále kumulativně zvyšovali až na $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Před podáním každé další koncentrace jsme vždy počkali, než se odpověď tkáně ustálí.

Zakončení screeningu:

Po stabilizaci odpovědi na poslední dávku testovaného katecholu jsme do měřicí nádobky přidali $50 \mu\text{l}$ nitroprusidu sodného (NTS) (finální koncentrace $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). NTS navodil relaxaci tkáně, kterou jsme považovali za maximální, tedy 100 %.

2. Testování mechanismu účinku pro nejúčinnější derivát, 3 – methoxykatechol:

V sérii několika oddělených experimentů jsme testovali možný mechanismus účinku pro nejúčinnější derivát katecholu, 3–methoxykatechol (3-MOC). Nejdříve jsme postupovali stejným způsobem, jaký je popsán výše a provedli přípravu tkáně včetně stabilizace a testu kontraktility a integrity endotelu. Poté následoval vlastní pokus k ověření mechanismu účinku.

Testované mechanismy:

a) Testování závislosti vasodilatačního účinku na přítomnosti endotelu

Při přípravě tkáně jsme ještě před jejím zavěšením na háčky z některých aortálních kroužků odstranili endotel, u jiných jsme nechali endotel neporušený. K odstranění jsme použili dentální nit, kterou jsme provlékli skrz kroužky a endotel jemně setřeli. S takto přichystanými kroužky jsme již postupovali podle výše uvedeného postupu. Prvním krokem vlastního pokusu pak bylo navození kontrakce noradrenalinem (finální koncentrace $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Dále jsme přidávali kumulativně rostoucí dávky testované sloučeniny – 3-MOC (finální koncentrace 100 nmol.l^{-1} – $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Nakonec jsme přidali NTS (v nádobkách $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$), jím způsobenou dilataci jsme považovali za 100%.

Všechny další mechanismy jsme testovali pouze na aortálních kroužcích zbavených endotelu.

b) Testování, zda je 3-MOC antagonistou vápníkových kanálů L-typu

Vlastní pokus jsme zahájili přidáním KCl (finální koncentrace 15 mmol.l^{-1}) pro zlepšení kontraktility tkáně. Pokud se objevila mírná reakce, vyčkali jsme, až došlo ke stabilizaci odpovědi. Následovala 30ti minutová inkubace tkáně s 3-MOC v požadované koncentraci ($6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ odpovídající EC_{20} nebo $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ odpovídající EC_{80}). 3-MOC byl rozpuštěn v DMSO. Jako pozitivní kontrola byl použit známý blokátor vápníkových kanálů nifedipin (finální koncentrace 150 nmol.l^{-1}) a jako negativní kontrola čistý DMSO. Bay K8644 v roztoku DMSO a dále naředěný vodou miliQ na potřebné koncentrace jsme postupně kumulativně přidávali ve vzrůstající koncentraci (v nádobce 1 nmol.l^{-1} – $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) k navození vasokonstrikce. Tato část experimentu probíhala za šera (Schulerovy nádobky zakryté alobalem v zatemněné místnosti), protože stabilita Bay K8644 je ovlivněna světlem. Na závěr pokusu jsme přidali KCl (finální koncentrace 60 mmol.l^{-1}) k navození kontrakce, kterou jsme považovali za maximální (Schéma 1).

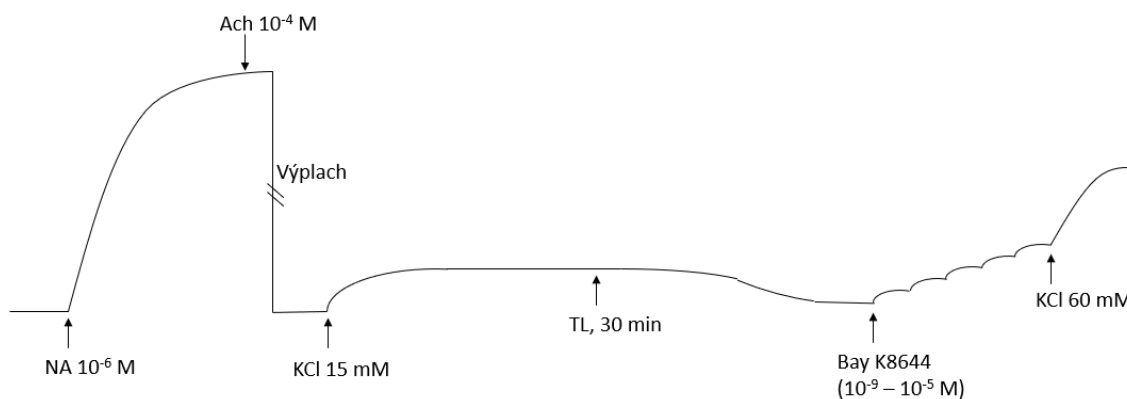


Schéma 1

c) Testování, zda má 3-MOC vliv na vasodilataci navozenou NO

Vlastní pokus začal přidáním noradrenalinu (v nádobkách koncentrace $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$), jež navodil kontrakci. Po nastolení fáze plató jsme přidali 3-MOC ($6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ odpovídající EC_{20}). Po stabilizaci tkáně jsme přidávali nitroprusid sodný v kumulativně rostoucích dávkách (finální koncentrace $100 \text{ pmol.l}^{-1} - 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$) k navození vasodilatace (Schéma 2).

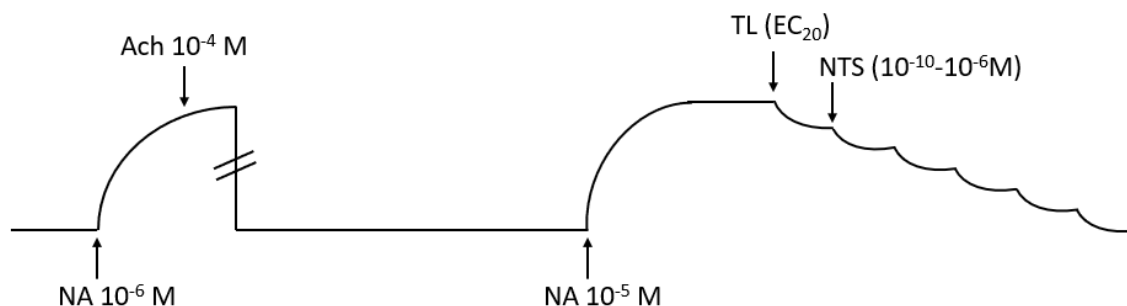


Schéma 2

d) Testování, zda je 3-MOC aktivátorem solubilní guanylátcyklázy

Vlastní pokus jsme zahájili přidáním ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on) (finální koncentrace $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a nechali 30 minut inkubovat. ODQ bylo rozpuštěno v DMSO na koncentraci 10 mmol.l^{-1} a naředěno na požadovanou koncentraci miliQ vodou. Následně jsme podali NA (finální koncentrace $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a navodili kontrakci. Postupně jsme kumulativně přidávali testovanou látku (3-MOC) (finální koncentrace $100 \text{ nmol.l}^{-1} -$

100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Pokus jsme zakončili maximální relaxací navozenou podáním NTS (finální koncentrace 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) (Schéma 3).

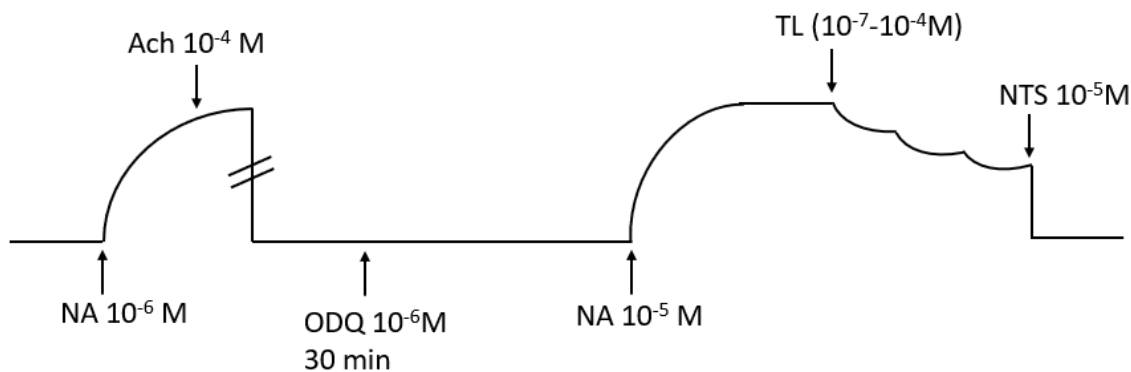


Schéma 3

e) Testování, zda je 3-MOC aktivátorem PKG

Do nádobek jsme odděleně přidali dva různé inhibitory, DT-3 nebo Rp-8-pCPT-cGMPS (pro oba finální koncentrace 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a nechali 30 minut inkubovat. Látky jsme připravili rozpuštěním v DMSO a zředěním pomocí miliQ vody stejně jako v předchozím případě. Jako kontrolní roztok jsme použili DMSO ve stejné koncentraci, jakou měly roztoky inhibitorů. Pomocí NA (finální koncentrace 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) jsme následně kontrahovali tkáň. Testovanou látku jsme přidali jednorázově v koncentraci 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ odpovídající hodnotě EC_{90} . Experiment jsme dokončili navozením 100% relaxace pomocí NTS (v nádobkách 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) (Schéma 4).

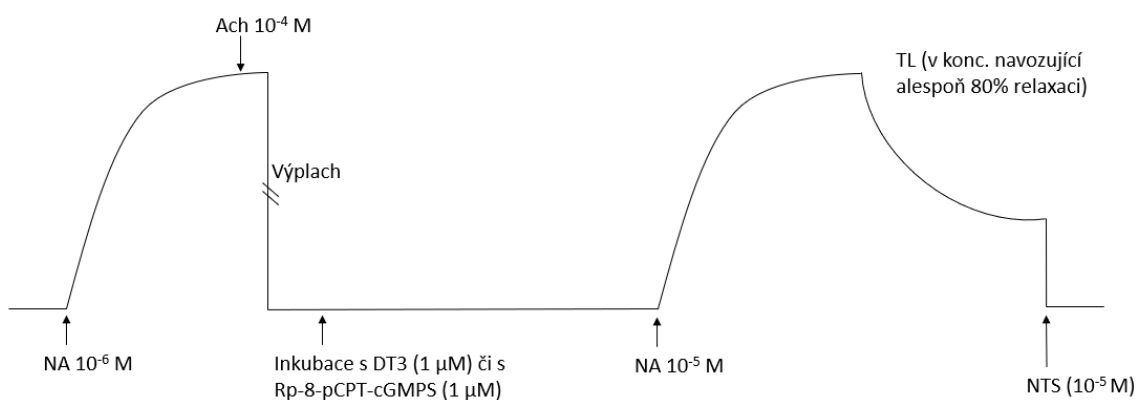


Schéma 4

5.3.2. Zhodnocení naměřených dat

K vyhodnocení naměřených dat jsme používali programy Excel a GraphPad Prism 9.

Screening:

Pomocí softwaru S.P.E.L. Advanced Kymograph Software jsme průběžně zaznamenávali hodnoty, které navodily vasodilataci tkáně, pro jednotlivé koncentrace všech testovaných derivátů katecholu. Tyto hodnoty jsme přepočítali na procenta z maximální relaxace cévy (tj. z relaxace navozené NTS) a vynesli do grafů. Získali jsme tak CRC křivky, které zobrazují závislost navozené relaxace tkáně (%) na koncentraci zkoušených derivátů. Z křivek jsme odečetli hodnoty EC_{50} všech testovaných derivátů (EC_{50} je hodnota vyjadřující koncentraci, která navodí 50% relaxaci z maximální možné). Z těchto hodnot jsme sestrojili přehledný graf (Graf 1. uvedený níže), který umožňuje srovnání hodnot EC_{50} jednotlivých derivátů. Pro všechny hodnoty EC_{50} jsme také určili 95% konfidenční intervaly.

Testované mechanismy:

I při experimentech testujících možný mechanismus účinku jsme při vyhodnocování přepočítávali dosaženou relaxaci či kontrakci na procenta z maximální možné relaxace či kontrakce. Získané hodnoty jsme poté vynesli do grafů.

Vyhodnocení závislosti vasodilatačního účinku na přítomnosti endotelu:

Při procentuálním vyjadřování relaxace navozené 3-MOC jsme za maximální relaxaci považovali tu, kterou navodil NTS v koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů.

Vyhodnocení blokády vápníkových kanálů L-typu pomocí 3-MOC:

Bay K8644 navodilo kontrakci tkáně. Při přepočtu na procenta jsme za maximální možnou kontrakci považovali kontrakci navozenou KCl v koncentraci 60mmol.l^{-1} . Významnost jsme hodnotili pomocí testu 2wayANOVA.

Vyhodnocení vlivu 3-MOC na vasodilataci navozenou NTS:

Dilataci, kterou způsobil nitroprusid sodný, jsme vyjádřili jako procenta z prekontrakce. K hodnocení významnosti jsme použili překryv konfidenčních intervalů.

Vyhodnocení aktivace sGC:

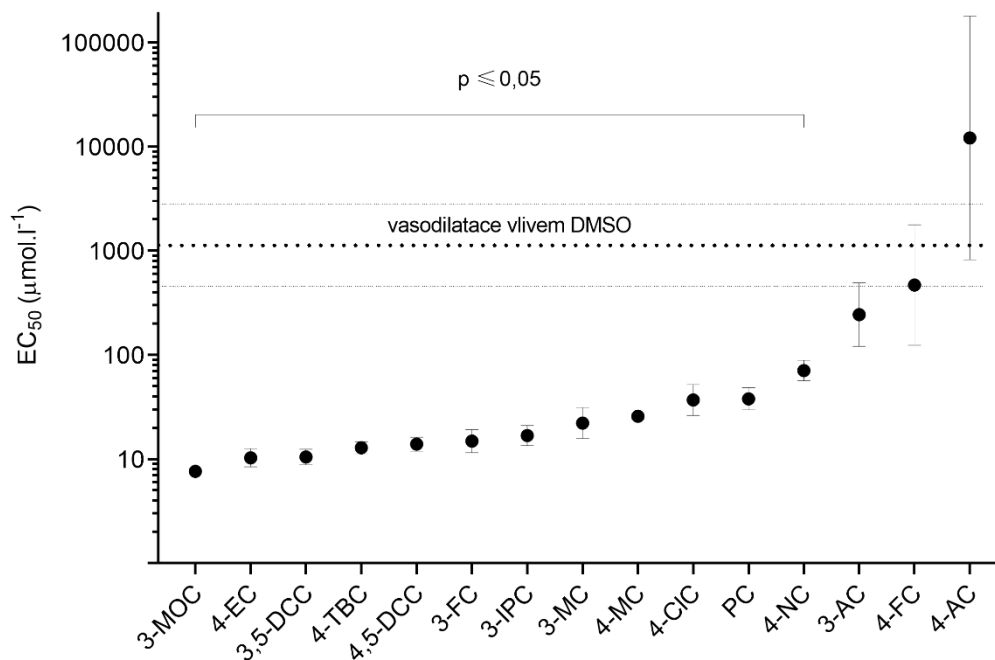
Procentuální přepočet dilatace navozené 3-MOC jsme vyjádřili z prekontrakce. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů.

Vyhodnocení aktivace PKG:

Při vyjadřování dilatace navozené přidáním 3-MOC jsme považovali za stoprocentní relaxaci tu, kterou navodil NTS v koncentraci $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$. K hodnocení významnosti jsme použili test 2wayANOVA.

6. VÝSLEDKY

1. Screening

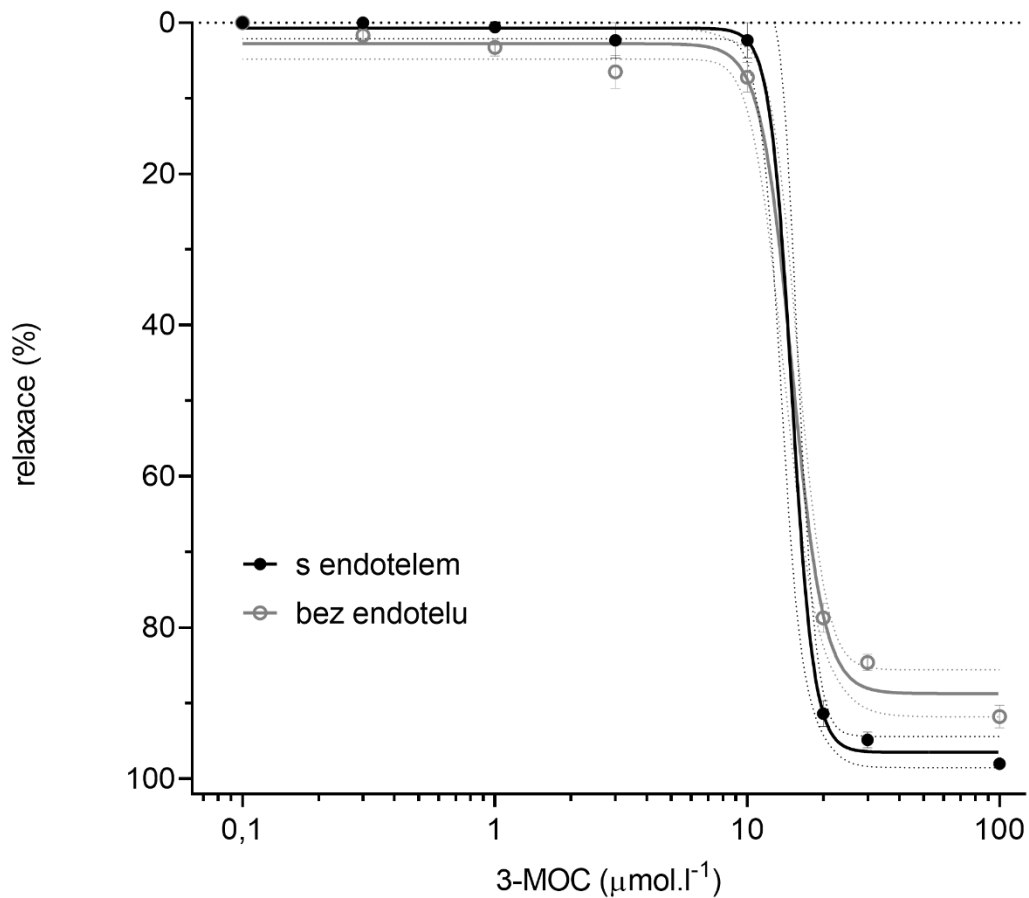


Graf 1. Graf na horizontální ose zobrazuje výčet testovaných derivátů katecholu seřazených sestupně podle vasodilatační aktivity *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované noradrenalinem ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a na vertikální ose odpovídající hodnoty EC_{50} . Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr s 95% konfidenčním intervalem. V grafu je tečkovanou čarou znázorněna vasodilatace vlivem vehikula (DMSO v odpovídající koncentraci) rovněž s 95% konfidenčním intervalem. Zkratky derivátů jsou vysvětleny v Tab. 8 (viz str. 58). Významný rozdíl oproti kontrole byl určen na základě srovnání 95% konfidenčních intervalů.

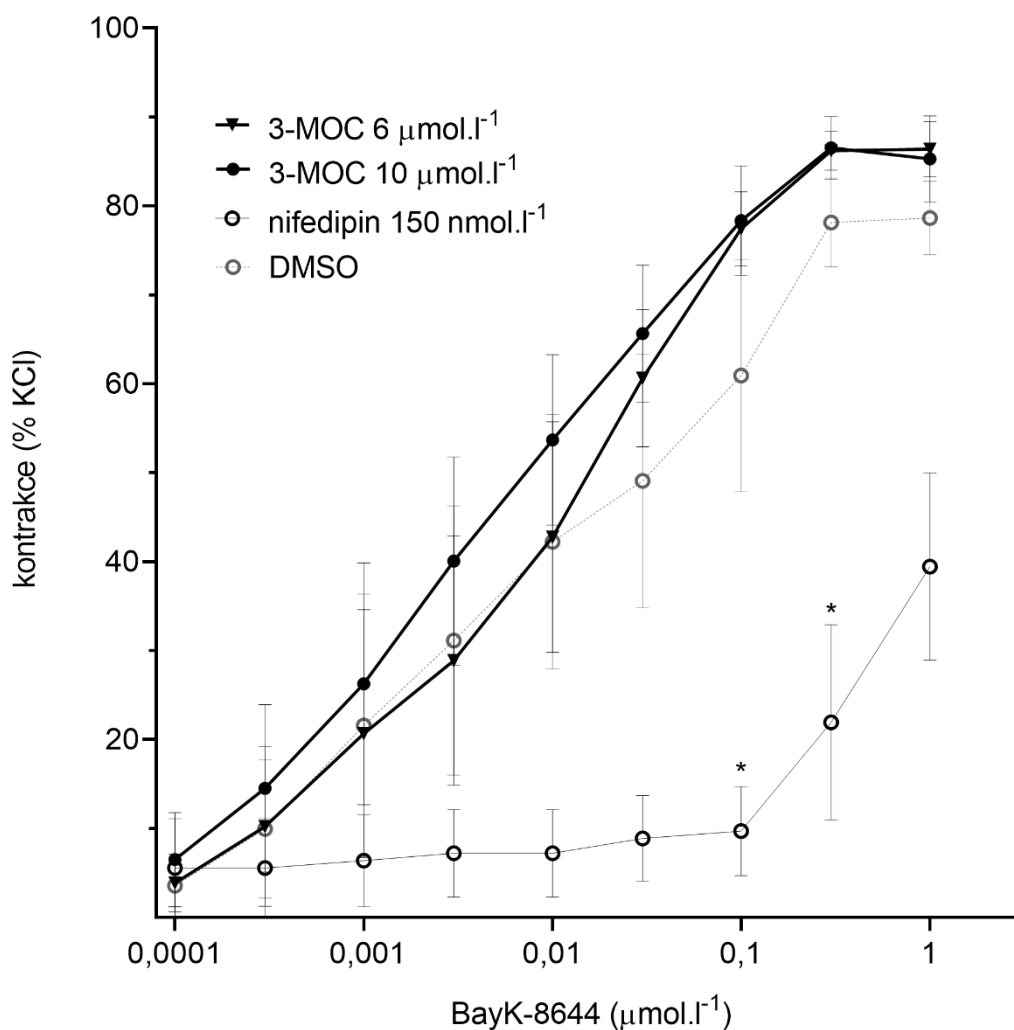
	EC₅₀ ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)	CI_{95%}	N (počet aortálních kroužků)
3-MOC	7,6	7,1-8,2	4
4-EC	10,3	8,4-12,6	6
3,5-DCC	10,5	8,8-12,4	5
4-TBC	12,8	11,2-14,7	6
4,5-DCC	13,9	11,9-16,2	6
3-FC	14,9	11,5-19,2	5
3-IPC	16,8	13,5-21,0	5
3-MC	22,2	15,7-31,3	3
4-MC	25,7	24,1-27,5	4
4-CIC	37,0	26,3-52,1	4
PC	37,9	29,7-48,3	4
4-NC	70,8	56,5-88,8	5
3-AC	244,4	121,1-492,9	4
4-FC	468,6	123,5-1777,2	4
kontrola	1133,3	457,5-2807,7	9
4-AC	12105,0	820,0-178694,1	3

Tab. 10 Tabulka uvádí hodnoty EC₅₀ vasodilatační aktivity vybraných derivátů katecholu získané *ex vivo* na izolované aortě potkana prekontrahované NA (10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) a kontroly (DMSO v odpovídající koncentraci). V dalších sloupcích jsou hodnoty 95% konfidenčního intervalu a počet použitých aortálních kroužků, vždy nejvýše dva kroužky ze stejného zvířete. Zkratky derivátů jsou vysvětleny v Tab. 8 (viz str. 58).

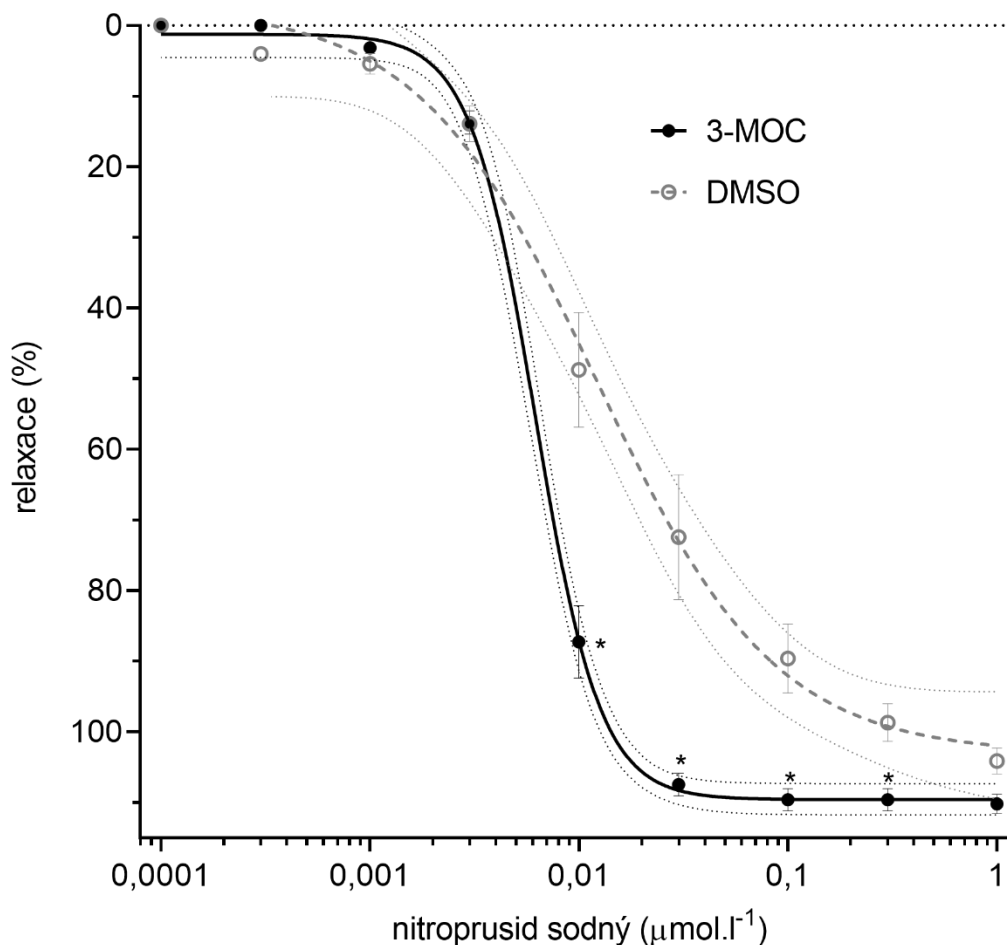
2. Mechanismus účinku



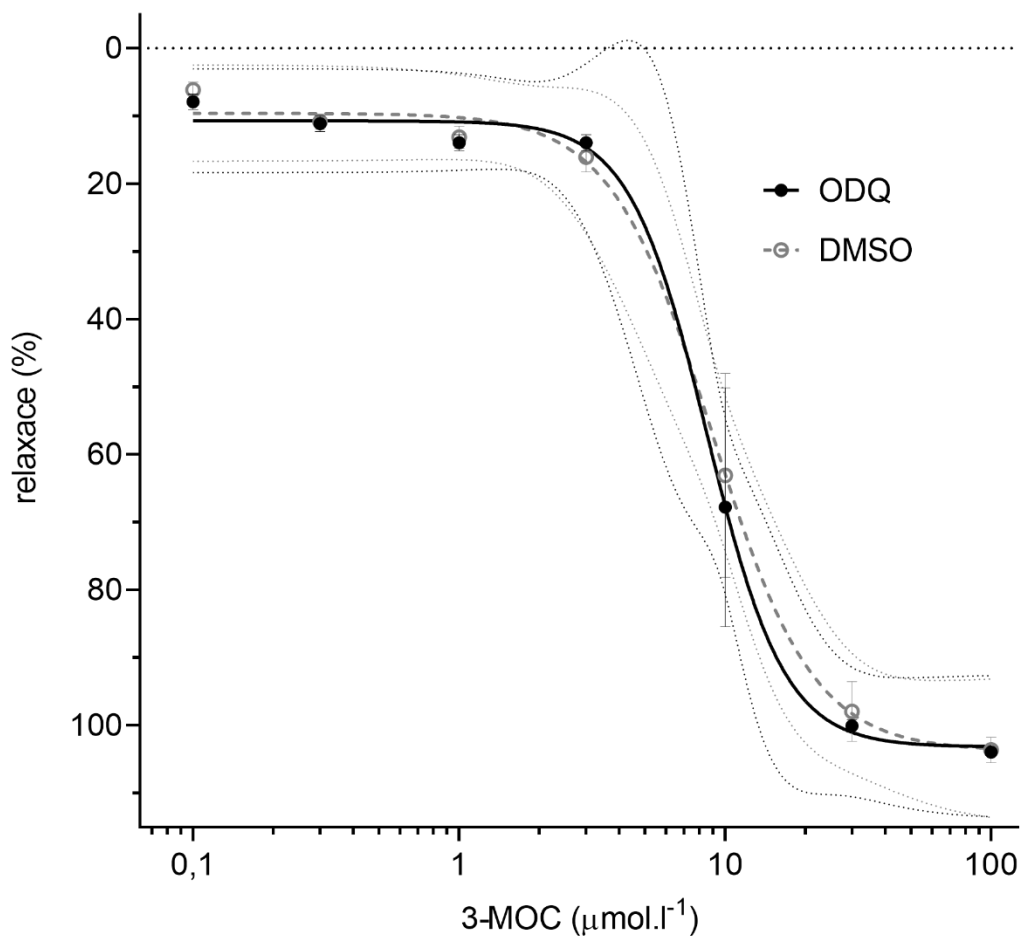
Graf 2. Graf závislosti vasodilatačního účinku na přítomnosti endotelu. Graf zobrazuje křivky závislosti relaxace (% z maximální relaxace navozené nitroprusidem sodným $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, vyjádřeno jako průměr $\pm\text{SEM}$ spolu s konfidenčním intervalem 95%) na koncentraci 3-MOC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) na *ex vivo* izolované a noradrenalinem ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) prekontrahované aortě potkana. Pro sestavení jedné křivky byly použity kroužky aorty se zachovalým endotelem a pro sestavení druhé křivky kroužky s mechanicky odstraněným endotelem. Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů. Pro obě křivky $n=4$ z různých zvířat, kroužky pro jednu křivku vždy z různých zvířat.



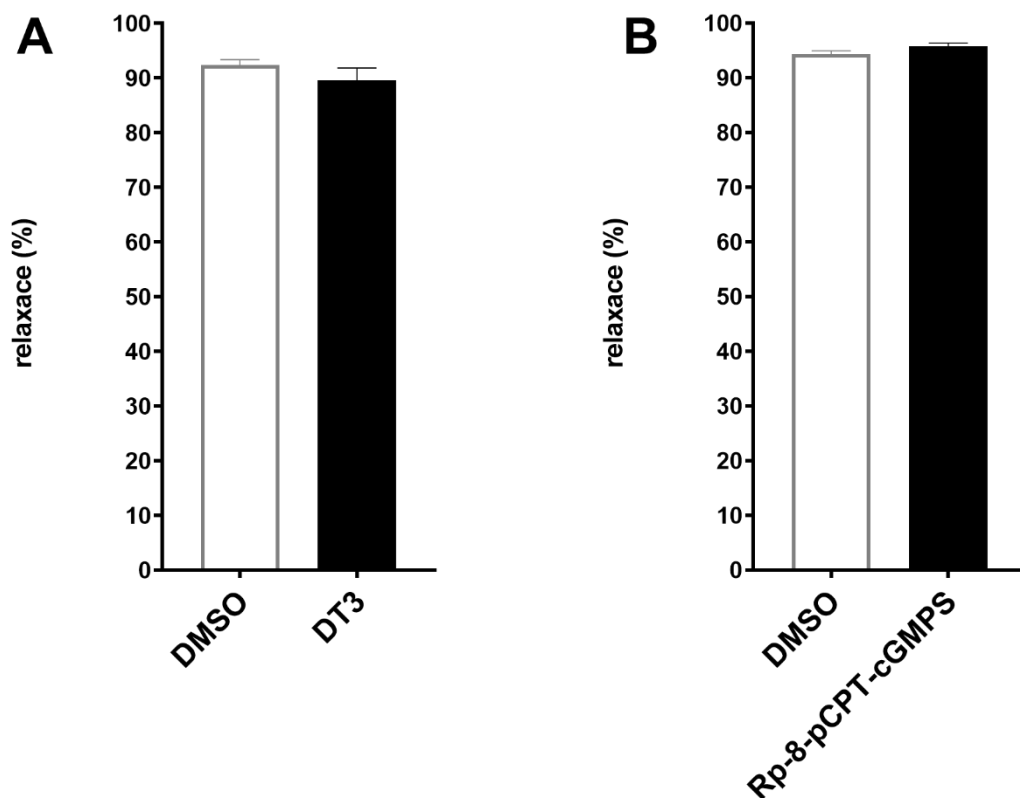
Graf 3. Vliv 3-MOC na L-typu kalciových kanálů na vaskulárním hladkém svalu. V pokusu *ex vivo* na kroužcích aorty potkana zbavené endotelu jsme sledovali, zda dojde k zablokování účinku aktivátoru L-typu kalciových kanálů, Bay K8644, předchozí inkubací s 3-MOC ve dvou různých koncentracích (6 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Jako pozitivní kontrola byl použit nifedipin (150 nmol.l^{-1}) a jako negativní DMSO. Graf znázorňuje závislost navozené vasokonstrikce (% z maximální kontrakce navozené KCl 60 mmol.l^{-1} , vyjádřeno jako průměr \pm SEM) na koncentraci Bay K8644 ($\mu\text{mol.l}^{-1}$). Významnost jsme hodnotili pomocí testu 2wayANOVA, * $p < 0,05$. Pro obě koncentrace 3-MOC a pro DMSO $n=5$, pro nifedipin $n=3$, kroužky pro jednu skupinu vždy z různých zvířat.



Graf 4. Vliv 3-MOC na vasodilataci navozenou NO. Vasodilatační účinky 3-MOC byly zkoumány na aortálních kroužcích s odstraněným endotelem a prekontrahovaných noradrenalinem ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). K aortálním kroužkům preinkubovaným 3-MOC ($6 \mu\text{mol.l}^{-1}$) byl následně v kumulativně se zvyšující koncentraci přidáván NTS ($100 \text{ pmol.l}^{-1} - 1 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Graf znázorňuje závislost relaxace (% z prekontrakce, vyjádřeno jako průměr \pm SEM spolu s 95% konfidenčním intervalem) na koncentraci NTS ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) na kroužcích inkubovaných s 3-MOC nebo s vehikulem (roztok DMSO). Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů, $*p < 0,05$. Z grafu je zřejmé, že 3-MOC potencuje vasodilatační účinek NTS. Pro 3-MOC $n=7$ a pro DMSO $n=5$, kroužky pro jednu křivku vždy z různých zvířat.



Graf 5. Vliv 3-MOC na aktivaci sGC. Vasorelaxační účinky 3-MOC *ex vivo* byly sledovány na aortálních kroužcích bez endotelu, které jsme inkubovali s kompetitivním inhibitorem sGC, ODQ, a následně prekontrahovali NA ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Jako kontrola byla použita inkubace s DMSO. Následně byl postupně přidáván 3-MOC v rostoucí koncentraci (100 nmol.l^{-1} – $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$) k navození vasodilatace. Graf znázorňuje závislost relaxace (% z prekontrakce, vyjádřeno jako průměr \pm SEM spolu s 95% konfidenčním intervalem) na koncentraci 3-MOC ($\mu\text{mol.l}^{-1}$). Významnost jsme hodnotili pomocí překryvu konfidenčních intervalů. Mezi křivkami jsme nezjistili signifikantní změny. Pro obě křivky $n=6$, kroužky pro jednu křivku vždy z různých zvířat.



Graf 6. Vliv 3-MOC na aktivaci PKG. Vasorelaxační účinky *ex vivo* jedné dávky 3-MOC ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) byly sledovány na aortálních kroužcích s mechanicky odstraněným endotelem. Kroužky byly inkubovány v přítomnosti dvou inhibitorů PKG: (A) DT3 nebo (B) Rp-8-pCPT-cGMPS (oba v koncentraci $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ v roztoku DMSO). Následně byly prekontrahovány pomocí NA ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a relaxovány 3-MOC ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Navozená relaxace je přepočítána na % z maximální relaxace navozené NTS ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$), vyjádřeno jako průměr \pm SEM. Jako kontrola byla použita inkubace s DMSO ve stejné koncentraci. Významnost jsme hodnotili pomocí nepárového t-testu. Nebyly zjištěny významné změny. Pro oba inhibitory $n=4$ a pro DMSO $n=3$, kroužky pro jednu skupinu vždy z různých zvířat.

7. DISKUSE

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) se stala hlavní příčinou úmrtí po celém světě. Na jejich nárůstu se značně podílelo zlepšování ekonomické situace v kombinaci s urbanizací, které vedlo k dramatickým změnám v pracovních činnostech, stravovacích návycích (zvýšení příjmu potravin s vysokým obsahem kalorií, soli), snížení fyzické aktivity a ke společenským změnám (rozmach kouření) (Zipes et al. 2018). Kvůli vysoké incidenci, závažnosti orgánových postižení a důsledkům KVO pro zdraví populace je důležité neustále hledat nové možnosti léčby (Klener 2012). Nové struktury léčivých látek mohou vycházet také z přírodních zdrojů, tomu odpovídá stálý zájem o terapeutický potenciál léčivých rostlin (Kumar a Padney 2013).

Mezi tyto látky můžeme zařadit i rostlinné polyfenoly, jejichž zkoumáním se dlouhodobě zabývá Výzkumná skupina kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie. Polyfenoly představují širokou skupinu látek zahrnující flavonoidy, stilbeny, fenolové kyseliny a lignany. Běžně se s těmito látkami setkáváme v potravě (ovoce, zelenina, kakao, čaj...). Některé epidemiologické studie prokázaly, že diety bohaté na polyfenoly mohou být při některých chronických stavech zdraví prospěšné. Například mohou snížit riziko kardiovaskulárních a metabolických poruch, určité výhody přinášejí také při onkologických onemocněních (Fraga et al. 2019, Pimpão et al. 2015, Andriantsitohaina et al. 2012). K pozitivním vlivům na lidský organismus, které napomáhají v prevenci KVO, patří schopnost těchto látek snižovat krevní tlak, podílet se na zlepšování průtoku krve, snižování cholesterolu a protizánětlivém působení (Fraga et al. 2019, Ganapathy et al. 2020). Řada polyfenolů má potenciál podporovat vaskulární zdraví také stimulací tvorby vasoprotektivních faktorů (NO, endotelový hyperpolarizační faktor – EDHF) a tak navozením vasodilatace a zabráněním aktivace trombocytů. Rovněž mohou zlepšovat funkci hladkého cévního svalstva (Andriantsitohaina et al. 2012). Postavení těchto látek v prevenci je zatím nedořešené. Doporučit konkrétní množství adekvátního příjmu polyfenolů, které by vedlo ke klinicky významným příznivým účinkům, je obtížné, protože jejich obsah v potravě je variabilní stejně jako dosažené plazmatické hladiny. Nicméně je jasné, že by se mělo jednat o pravidelný, nejlépe každodenní příjem (Andriantsitohaina et al. 2012).

Na protektivních účincích dietních polyfenolů se mohou významně podílet jejich metabolity, které ještě nedávno nebyly brány v potaz. Nejčastěji se jedná o sulfáty, dále o glukuronidy či methylované sloučeniny a také o malé fenolické látky vznikající v tlustém střevě, na jejichž tvorbě se významně podílí střevní mikrobiota. Tyto metabolity se mohou absorbovat, být bioaktivní a navozovat klinicky významné účinky (Fraga et al. 2019, Pimpão et al. 2015).

Při hodnocení vlivu přírodních polyfenolů je proto třeba zahrnout do úvah nejen parentní látky, ale také jejich metabolity. To samé platí pro analytické stanovení ve vzorcích plazmy. Plazmatické hladiny metabolitů přibližně korelují s přijatým množstvím parentních polyfenolů a u člověka se obvykle pohybují v desítkách až stovkách nM, nicméně u některých mohou dosahovat řádově až $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Například koncentrace katechol-sulfátu a pyrogallol-sulfátu dosahovala dokonce $\sim 20 \text{ mmol.l}^{-1}$ (Pimpão et al. 2015). Mezi jednotlivci je však vysoká variabilita, jak v plazmatických koncentracích u všech kvantifikovaných látek, tak i ve spektru detegovaných metabolitů. Podobně jako parentní látky, i metabolity polyfenolů jsou zpravidla rychle eliminovány z plazmy, což opět naznačuje, že k dosažení jejich dlouhodobějších stabilních koncentrací je nezbytný opakovaný pravidelný příjem polyfenolů potravou (Manach et al. 2004).

Mezi přirozené kolonické metabolity flavonoidů patří 4-methylkatechol, o kterém je známo, že má vasodilatační účinky (Pourová et al. 2018). Cílem mé diplomové práce bylo ověřit vasoaktivitu dalších vybraných derivátů katecholu, srovnat ji s aktivitou 4-methylkatecholu a u nejúčinnější látky testovat možné mechanismy účinku.

Screening vasoaktivního účinku derivátů katecholu

V screeningu derivátů katecholu jsme testovali vasoaktivitu celkem patnácti látek. Větší část z nich měla vasodilatační účinky ve srovnání s kontrolou a šest z nich mělo hodnotu EC_{50} nižší než $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Nejúčinnějším derivátem byl 3-MOC (3 – methoxykatechol) s hodnotou $EC_{50} = 7,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$, který jsme proto zvolili pro následné testování možného mechanismu účinku.

Testování mechanismu účinku 3-MOC

Při zjišťování mechanismu účinku 3-MOC jsme postupně testovali několik možností, které by mohly být zodpovědné za jeho vasodilatační působení. Nejdříve jsme zkoumali, zda může vasodilatace záviset na cévním endotelu. Při porovnávání výsledků pokusů na aortálních kroužcích s endotelem a bez endotelu jsme zjistili, že oba typy reagovaly srovnatelně. Navozená vasodilatace tak nebyla závislá na přítomnosti funkčního endotelu a je proto pravděpodobné, že látka působí přímo na hladký sval. Díky tomuto zjištění jsme z další práce vyloučili testování mechanismů spjatých s cévním endotelem (jako například vliv na IK_{Ca} a SK_{Ca} kanály a M-receptory) a soustředili se přímo na mechanismy spojené s cévním hladkým svalem.

Testovaná látka, 3-MOC má hodnotu pK_a 9,42 a pH plazmy je 7,4. Je-li vyšší pK_a látky než pH prostředí, znamená to, že látka bude v daném prostředí převážně v neionizované formě, která přechází přes buněčné membrány mnohem snadněji než ionizovaná forma (Štaud 2019). 3-MOC tak může působit jak nitrobuněčně, tak membránově. Ověřovali jsme proto oba typy mechanismů.

Testování nitrobuněčného mechanismu účinku 3-MOC:

Zjistili jsme, že 3-MOC potencuje relaxační účinky nitroprusidu sodného, který je donorem oxidu dusnatého působícího jako přímé vasodilatans. Tento fakt nás vedl k domněnce, že mechanismus účinku 3-MOC může být spjatý s dráhou NO/sGC/cGMP/PKG. Na této dráze NO difunduje do buněk hladkého svalu, kde se váže a aktivuje sGC (solubilní guanylátcyklázu), tím vzroste koncentrace cGMP, následuje aktivace PKG a svalová relaxace (detailnější popis viz kapitola: Oxid dusnatý str. 28). Proto jsme na této dráze následně provedli několik pokusů.

Jako první jsme testovali vliv na sGC. Nejprve jsme reverzibilně inhibovali sGC látkou ODQ a pomocí postupně se zvyšujících koncentrací 3-MOC jsme zkoušeli tuto inhibici zvrátit. Nicméně ani v nejvyšší použité koncentraci 3-MOC jsme působení ODQ nedokázali ovlivnit. Přímý vliv 3-MOC na sGC je proto nepravděpodobný.

Na stejné dráze jsme následně testovali vliv na PKG a využili jsme dvou inhibitorů PKG, DT-3 (selektivnější inhibitor PKG-I alfa) a Rp-8-pCPT-cGMPS (méně

selektivní inhibitor PKG-I alfa, PKG-I beta a PKG II). Tyto inhibitory nedokázaly vasodilatační účinek 3-MOC ovlivnit, neprokázali jsme proto ani tento mechanismus.

Testování membránového mechanismu účinku 3-MOC:

Vasokonstrikce a vasodilatace úzce souvisejí s koncentrací Ca^{2+} iontů v cévním hladkém svalu. Proto jsme testovali, zda by 3-MOC mohl být blokátorem membránových vápníkových kanálů Cav1.2 (L – typ), které představují hlavní zdroj extracelulárních Ca^{2+} iontů pro svalový stah. K tomuto experimentu jsme použili látku Bay K8644, která je analogem nifedipinu, ale působí jako aktivátor těchto kanálů. Vlivem Bay K8644 se zvyšuje vstup Ca^{2+} iontů do svalové buňky, nárůst koncentrace Ca^{2+} v cytosolu vede k aktivaci MLCK a fosforylaci myozinu, což následně umožní interakci mezi aktinem a myozinem a vznik kontrakce. Velikost navozené kontrakce je dávkově závislá na koncentraci Bay K8644. V mé práci 3-MOC nedokázal ovlivnit účinek Bay K8644, z čehož usuzujeme, že nepůsobí jako blokátor vápníkových kanálů Cav1.2 (L – typ).

Konkrétní mechanismus účinku 3-MOC se nám zatím nepodařilo odhalit a jsou proto potřeba další experimenty. Do úvahy připadá například přímá aktivace nitrobuněčné ATPázy SERCA (sarko/endoplazmatické retikulum Ca^{2+} ATPáza), která je též součástí dráhy (NO/sGC/cGMP/PKG) a může být aktivována pomocí PKG nebo přímo NO (bez účasti PKG) (Adachi et al. 2004). SERCA je pumpa, jejímž úkolem je pumpování Ca^{2+} z cytoplazmy do sarko/endoplazmatického retikula, čímž udržuje Ca^{2+} homeostázu (Chemaly et al. 2018, Periasamy a Kalyanasundaram 2007). Snižováním koncentrace intracelulárního vápníku přispívá ke svalové relaxaci a zároveň obnovuje zásoby iontů Ca^{2+} v SR nezbytné pro další svalovou kontrakci (Periasamy a Kalyanasundaram 2007). 3-MOC může ovšem působit i mimo dráhu NO/sGC/cGMP/PKG. Například prostřednictvím aktivace dráhy PKA. PKA se účastní několika dějů, které vedou k vasodilataci (podrobněji viz kapitola: Prostanoidy str. 29). Další možností je účinek na plazmatické membráně cévního hladkého svaly, kde by 3-MOC mohl např. otevírat K^+ kanály, a tak zvyšovat polaritu membrány nebo naopak působit inhibičně na některé z TRP kanálů.

Tato diplomová práce je součástí širšího výzkumu a účinky 3-MOC budou v nejbližší době ověřovány ještě dalšími způsoby. V plánu jsou testování *ex vivo* na modelu prasečí koronární cévy a také testování *in vivo* na hypertenzních potkanech.

8. ZÁVĚR

V této práci jsme se zabývali testováním vasodilatačních účinků vybraných derivátů katecholu *ex vivo* na izolované aortě potkana a u neúčinnější látky, 3-methoxykatecholu, jsme následně ověřovali možné mechanismy účinku.

Díky provedeným experimentům jsme došli k těmto závěrům:

- Většina z patnácti testovaných derivátů katecholu byla schopna navodit vasodilataci a šest z nich mělo hodnotu EC_{50} nižší než $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$
- Neúčinnějším derivátem byl 3-methoxykatechol, jehož hodnota EC_{50} byla $7,6 \mu\text{mol.l}^{-1}$, a proto jsme ho zvolili pro testování možného mechanismu účinku
- Vasodilatační účinky 3-methoxykatecholu byly nezávislé na přítomnosti funkčního endotelu
- Na membráně buňky cévního hladkého svalu 3-methoxykatechol neovlivňoval vápníkové kanály Cav1.2 (L – typ)
- 3-methoxykatechol potencoval vasodilatační účinky oxidu dusnatého (podaného v podobě donoru, nitroprusidu sodného)
- Na dráze NO/sGC/cGMP/PKG 3-methoxykatechol nepůsobil ani jako aktivátor solubilní guanylátcyklázy ani jako aktivátor proteinkinázy G

9. LITERATURA

1. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schöneich C, Cohen RA. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat Med* 2004;10(11):1200-1207.
2. Ajay M, Gilani AH, Mustafa MR. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2003;74(5): 603–612.
3. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005:490. ISBN: 80-902906-2-0
4. Andersen ØM, Markham KR. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006:219-248. ISBN: 978-0-8493-2021-7
5. Andriantsitohaina R et al. Molecular mechanism of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr* 2012;108(9):1532 -1549.
6. Balko J, Tonar Z, Varga I a kol. *Memorix histologie*. 2. vyd. Praha: Triton, 2017:141, 151-152, 205-217. ISBN: 978-80-7553-249-7
7. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-333.
8. Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill, 2011:52-65, 171-225, 277-355, 721-730, 944. ISBN: 978-0-07-176939-6
9. Cassidy A, Minihane AM. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *Am J Clin Nutr* 2017;105(1):10-22.

10. Černohorská J. Synergický účinek flavonoidů – cesta k léčbě žilního onemocnění. In: Medicína po promoci. 2018. Dostupné na URL: <https://www.tribune.cz/archiv/synergicky-ucinek-flavonoidu-cesta-k-lecbe-zilniho-onemocneni/>. Přístup: 30. 10. 2021
11. Čihák R. Anatomie 1. 3. upravené a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011: 23-24. ISBN 978-80-247-3817-8
12. Čihák R. Anatomie 3. Praha: Grada, 1997:3-8, 69-78, 170. ISBN 802471132X
13. Durante A et al. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 2012;18(7):981-1004.
14. Dylevský I. Somatologie: pro předmět Základy anatomie a fyziologie člověka. 3., přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2019:109-111. ISBN 978-80-271-2111-3
15. Feliciano RP et al. Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols. *Arch Biochem Biophys* 2016;599:31-41.
16. Ferreyra M. L. F., Rius S. P., Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 2012;3:222.
17. Formica J, Regelson W. Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 1995;33(12):1061-1080.
18. Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct* 2019;10(2):514.

19. Ganapathy R et al. Cardioprotective potential of polyphenols rich Thraatchathi Chrooranam against isoproterenol induced myocardial necrosis in experimental rats. *BMC Complement Med Ther* 2020;20(1):356.
20. Geha RM, Rebrin I, Chen K, Shih JCh. Substrate and Inhibitor Specificities for Human Monoamine Oxidase A and B Are Influenced by a Single Amino Acid. *J Biol Chem* 2001;276(13):9877-9882.
21. 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): H2255-64.
22. Gross M. Flavonoids and Cardiovascular Disease. *Pharmaceutical Biology* 2004;42 (1):21-35.
23. Gründemann D et al. Activation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) from rat expressed in 293 cells. *Br J Pharmacol* 2002;137(6):910-918.
24. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002;13(10):572-584.
25. Holibková A, Laichman S. Přehled anatomie člověka. 3. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2004:98. ISBN: 80-244-0495-8
26. Horinouchi T, Terada K Higashi T, Miwa S. Endothelin Receptor Signaling: New Insight Into Its Regulatory Mechanisms. *J Pharmacol Sci* 2013;123(2):85-101.
27. Houde M, Desbiens L, D'Orléans-Juste P. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. In: *Adv Pharmacol* 2016;77:143-75.

28. Chemaly ER, Troncone L, Lebeche D. SERCA control of cell death and survival. *Cell Calcium* 2018;69:46-61.
29. Jabor A a kol. Vnitřní prostředí. Praha: Grada Publishing, a.s., 2008:157-165. ISBN: 978-80-247-1221-5
30. Jameson JL, Groot LJ a kol. *Endocrinology Adult and Pediatric*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010:1990-2018. ISBN: 978-1-4160-5583-9
31. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Základy histologie*. 7. vyd. Jinočany: H & H, 1997:184, 200-213. ISBN 80-85787-37-7
32. Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*. 14th ed. New York: The McGraw-Hill Education, 2018:32, 89-99, 139-148,173, 285-286, 304-311, 321-345, 681. ISBN 978-1-259-64115-2
33. Kim Y, Je Y. Flavonoid intake and mortality from cardiovascular disease and all causes: A meta-analysis of prospective cohort studies. In: *Clin Nutr ESPEN* 2017;20:68-77.
34. Kittnar O a kol. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2011:114-120, 161-187, 536-537. ISBN: 978-80-247-3068-4
35. Klabunde RE. Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation. In: *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2019. Dostupné na URL: <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP026>. Přístup: 21. 7. 2021
36. Klener P et al. *Vnitřní Lékařství*. 4. přepracované a doplněné vyd. Praha: Galén a Karolinum, 2012:175, 328-331. ISBN: 978-80-7262-857-5
37. Konrádová V, Uhlík J, Vajner L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H & H, 2000:97-100, 115-122, 233. ISBN 80-86022-80-3

38. Kumar S, Padney AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *ScientificWorldJournal*. 2013:1-16.
39. Langmeier M a kol. *Základy lékařské fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009:56-57. ISBN: 978-80-247-2526-0
40. Lenasi H. *Endothelial Dysfunction: Old Concepts and New Challenges*. London: IntechOpen Limited, 2018:329. ISBN: 978-1-78984-253-1
41. Lichnovský V, Malínský J, Michalíková Z. *Přehled histologie člověka v obrazech II. díl*. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009:12. ISBN 978-80-244-2277-0
42. Lincoln TM, Dey N, Sellak H. Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(3):1421-30.
43. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. *Farmakologie a toxikologie*. 2 vyd., české. Praha: Grada, 2004:101-103, 137-141, 157, 261-262, 447. ISBN: 80-247-0836-1
44. Madhani M, Scotland RS, MacAllister RJ, Hobbs AJ. Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide–cyclic GMP signalling. *Br J Pharmacol* 2003;139(7):1289-96.
45. Mahmoud AM, Bautista RJH, Sandhu MA, Hussein OE. Beneficial Effects of Citrus Flavonoids on Cardiovascular and Metabolic Health. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. Dostupné na URL: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/5484138/>. Přístup: 11. 10. 2021
46. Manach C, Scalbert A, Morand Ch, Rémésy Ch, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79 (5):727-747.

47. Martínek J, Vacek Z. Histologický atlas. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009:11-12. ISBN: 978-80-247-2393-8
48. Masterson LR, Yu T, Shi L, Wang Y, Gustavsson M, Mueller MM, Veglia G. cAMP-dependent protein kinase A selects the excited state of the membrane substrate phospholamban. *J Mol Biol.* 2011;412(2):155-64.
49. Migkos T, Pourová J, Vopršalová M, Auger C, Schini-Kerth V, Mladěnka P. 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):708-716.
50. Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipský T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 2010;49(6):963-975.
51. Moratinos J, Reverte M. Effects of catecholamines on plasma potassium: the role of alpha- and beta-adrenoceptors. *Fundam Clin Pharmacol* 1993;7(3-4):143-53.
52. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005;99(1):6-38.
53. Muñoz-Durango N et al. Role of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System beyond Blood Pressure Regulation: Molecular and Cellular Mechanisms Involved in End-Organ Damage during Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* 2016;17(7):797.
54. Nachtigal P. Fyziologie vylučovacího systému. In: Faf.cuni.cz: studijní materiály Katedry biologických a lékařských věd. 2019. Dostupné na URL: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KBLV/>. Přístup: 4. 8. 2021

55. Najmanová I et al. 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):981-991.
56. Ostertag LM, O'Kennedy N, Horgan GW, Kroon PA, Duthie GG, de Roos B. In vitro anti-platelet effects of simple plant-derived phenolic compounds are only found at high, non-physiological concentrations. In: *Mol Nutr Food Res*. 2011;55(11):1624-36.
57. Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 2007;35(4):430-42.
58. Petrovický P a spol. Anatomie s topografií a klinickými aplikacemi II. svazek. Martin: Vydavatelství Osveta, spol. s r.o., 2001:26-30. ISBN: 80-8063-046-1
59. Petřek J. Základy fyziologie člověka pro nelékařské zdravotnické obory. Praha: Grada Publishing, a.s., 2019:52. ISBN: 978-80-271-2807-5
60. Pimpão RC, Ventura MR, Ferreira RB, Williamson G, Santos CN. 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):454-63.
61. 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;111:36-43.
62. Pudil R, Tichý M. Natriuretické peptidy a srdeční selhání – současný pohled. *Klin. Biochem. Metab.* 2010;18(39):190-95.

63. Púzserová A. Zdravé endotelové bunky-cesta za zdravším životom. Posterus [serial online] 2016; 9(1):1-8. 25.1.2016. Portál pre odborné publikovanie. In: Posterus. Dostupné na URL: <http://www.posterus.sk/?p=18309>. Prístup: 15. 11. 2021
64. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang and Dale's Pharmacology. 7th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2012:560-630. ISBN: 978-1-4377-1933-8
65. Robertson D, Biaggioni I, Burnstock G, Low PA, Paton JER. Primer on the Autonomic Nervous System. 3. vyd. London: Elsevier. 2012:37-43. ISBN: 978-0-12-386525-0
66. Rokyta R a kol. Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech. Praha: ISV nakladatelství, 2000:47, 105, 249. ISBN: 80-85866-45-5
67. Rose RA, Giles WR. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. J Physiol 2008;586(2):353-66.
68. Shier D, Butler J, Lewis R. Hole's Human Anatomy & Physiology. 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2007:302, 357, 414-432, 504, 513, 582-583, 601, 807. ISBN: 978-0-07-282953-2
69. Schiffrin EL. Vascular endothelin in hypertension. Vascul Pharmacol. 2005;43(1):19-29.
70. Silbernagl S, Despopoulos A. Color Atlas of Physiology. 6th ed. Stuttgart; New York: Thieme, 2009:72, 82, 294. ISBN 978-3-13-545006-3
71. Silbernagl S, Lang F. Atlas patofyziologie člověka. 1. vyd. české. Praha: Grada Publishing, spol. s r.o., 2001:260, 294. ISBN: 80-7169-968-3

72. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol Rev* 2004;56(3):387-437.
73. Siragy HM. HM. The angiotensin II type 2 receptor and the kidney. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2010;11(1):33-6.
74. Slonková V. Nová klasifikace venoaktivních léků. In: *Praktické lékárenství*. 2017; 13 (2): 63-66. Dostupné na URL: https://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-201702-0004_Nova_klasifikace_venoaktivnich_leku.php. Přístup: 29. 10. 2021
75. Solomon EP. *Introduction to Human Anatomy and Physiology*. 4th ed. Maryland Heights: Saunders Elsevier, 2015;190. ISBN: 978-0-323-23925-7
76. Spencer JPE, Crozier A. *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*. New York; Boca Raton; London: CRC Press Taylor & Francis Group, 2012:295-300. ISBN: 978-1-4398-4827-2
77. Spilková J a kol. *Farmakognozie*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2016:102-105. ISBN: 978-80-246-3264-3
78. Stotz WH, Li D, Johns RA. Exogenous Nitric Oxide Upregulates p21^{waf1/cip1} in Pulmonary Microvascular Smooth Muscle Cells. *J Vasc Res* 2004;41(3):211-19.
79. Štaud F. Transport léčiv přes biologické membrány. In: *Faf.cuni.cz: studijní materiály katedry farmakologie a toxikologie*. 2019. Dostupné na URL: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KFLT/>. Přístup: 7. 11. 2021

80. Štejfa M a spol. Kardiologie. 3 přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2007:51-52, 284-286, 425. ISBN: 978-80-247-1385-4
81. Švihovec J a kol. Farmakologie. Praha: Grada Publishing, a.s., 2018:177-181, 321-323. ISBN: 978-80-271-2150-2
82. Takeya K, Wang X, Kathol I, Loutzenhiser K, Loutzenhiser R, Walsh MP. Endothelin-1, but not angiotensin II, induces afferent arteriolar myosin diphosphorylation as a potential contributor to prolonged vasoconstriction. *Kidney Int* 2015;87(2):370-81.
83. Tayebati SK, Lokhandwala MF, Amenta F. Dopamine and Vascular Dynamics Control: Present Status and Future Perspectives. *Curr Neurovasc Res* 2011;8(3):246-57.
84. Trojan S a kol. Lékařská fyziologie. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2003:104, 180, 196-208, 230, 453, 483, 503, 572. ISBN: 80-247-0512-5
85. Vermerris W, Nicholson R. Phenolic Compound Biochemistry. Dordrecht: Springer Science+Business Media B. V., 2008:91. ISBN: 978-1-4020-5163-0
86. Villalón CM, Centurión D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol* 2007;376:45-63.

87. Viskupičová J, Ondrejovič M, Šturdík E. Bioavailability and metabolism of flavonoids. In: Journal of Food and Nutrition Research. 2008. Dostupné na URL:
https://www.researchgate.net/profile/Jana_Viskupicova2/publication/260529912_Bioavailability_and_metabolism_of_flavonoids/links/0c96053181e51e735f000000/Bioavailability-and-metabolism-of-flavonoids.pdf.
Přístup: 20. 11. 2021
88. Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. Am J Clin Nutr 2005;81(1):292S-297S.
89. Vlček J, Fialová D a kol. Klinická farmacie I. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010:73-80. ISBN: 978-80-247-3169-8
90. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Res Int 2000;33(6):423-47.
91. Yao LH et al. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. Plant Foods Hum Nutr 2004;59(3):113-22.
92. Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Mann DL, Tomaselli GF. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. 11th. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2018:1-2. ISBN: 978-0-323-46342-3