

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**MECHANIZMUS VAZODILATAČNÉHO ÚČINKU KYSELINY
3-HYDROXYFENYLOCTOVEJ *EX VIVO***

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Monika Štefancová

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Táto práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové dňa

.....

Monika Štefancová

Týmto ďakujem svojej školiteľke doc. PharmDr. Jane Pourovej, Ph.D. za odborné vedenie, ochotu a rady pri spracovaní tejto práce. Ďalej by som chcela poďakovať Patrícii Dias, MSc. za spoluprácu na experimentálnej časti práce. V neposledom rade chcem poďakovať svojej rodine za podporu počas celého štúdia.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študentka: Monika Štefancová

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

Názov diplomovej práce: Mechanizmus vazodilatačného účinku kyseliny
3-hydroxyfenyloctovej *ex vivo*

Z klinických štúdií je známe, že príjem polyfenolov potravou pôsobí ako prevencia kardiovaskulárnych ochorení. Avšak samotné pôvodné zlúčeniny majú často nízku biologickú dostupnosť. Dôraz sa preto kladie na ich bioaktívne metabolity. Medzi takéto metabolity patrí aj kyselina 3-hydroxyfenyloctová (3-HPAA). Cieľom tejto práce bolo overiť mechanizmus vazodilatačného účinku 3-HPAA pomocou štandardizovanej metódy *ex vivo* na izolovanej koronárnej artérii prasaťa. Podaním 3-HPAA došlo k relaxácii kontrahovaných segmentov prasacej artérie mechanizmom čiastočne závislým na celistvosti endotelu. Inhibíciou endoteliálnej syntázy oxidu dusnatého bola relaxácia značne oslabená. Blokádou SK_{Ca} a IK_{Ca} kanálov, muskarínových receptorov, cyklooxygenázy či vaptínových kanálov typu L nedošlo prostredníctvom 3-HPAA k žiadnemu ovplyvneniu relaxácie. Ukázalo sa teda, že 3-HPAA spôsobuje dávkovo závislú vazodilatáciu koronárnych artérií *ex vivo* prinajmenšom sčasti sprostredkovanú endotelom s účasťou oxidu dusnatého.

Kľúčové slová: kyselina 3-hydroxyfenyloctová, *ex vivo*, cieva, vazodilatácia, mechanizmus

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Monika Štefancová

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

Title of diploma thesis: Vasodilatory effects of 3-hydroxy phenylacetic acid: *ex vivo* mechanism of action

It is known from clinical studies that the intake of polyphenols from food acts as a prevention of cardiovascular diseases. However, the parent compounds themselves often have low bioavailability. The emphasis is therefore on their bioactive metabolites. 3-hydroxy phenylacetic acid (3-HPAA) is among such metabolites. The aim of this study was to verify the mechanism of the vasodilatory effect of 3-HPAA using standardized *ex vivo* method on an isolated pig coronary artery. The administration of 3-HPAA resulted in relaxation of maximally contracted segments of porcine artery by mechanism partially dependent on the integrity of endothelium. By inhibiting endothelial nitric oxide synthase, the relaxation was significantly impaired. The blockage of SK_{Ca} and IK_{Ca} channels, muscarinic receptors, cyclooxygenase or L-type calcium channels did not affect relaxation. Thus, 3-HPAA causes dose-dependent vasodilatation of coronary arteries *ex vivo* at least partially mediated by endothelium with the participation of nitric oxide.

Key words: 3-hydroxy phenylacetic acid, *ex vivo*, vessel, vasodilatation, mechanism

OBSAH

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | ZOZNAM SKRATIEK | 8 |
| 2 | ÚVOD..... | 10 |
| 3 | TEORETICKÁ ČASŤ..... | 11 |
| 3.1 | Kardiovaskulárny systém..... | 11 |
| 3.1.1 | Cievny systém..... | 11 |
| 3.1.1.1 | Histológia ciev | 11 |
| 3.1.1.2 | Vaskularizácia a inervácia ciev..... | 12 |
| 3.1.1.3 | Typy krvných ciev | 13 |
| 3.2 | Hladký cievny sval..... | 16 |
| 3.2.1 | Mechanizmus kontrakcie hladkého svalu..... | 18 |
| 3.3 | Regulácia vazokonstrikcie a vazodilatácie | 19 |
| 3.3.1 | Endotelová regulácia | 20 |
| 3.3.1.1 | Oxid dusnatý..... | 20 |
| 3.3.1.2 | Prostanoidy..... | 21 |
| 3.3.1.3 | Endotelín | 23 |
| 3.3.2 | Enzymatická regulácia | 24 |
| 3.3.2.1 | Systém renín-angiotenzín-aldosterón..... | 24 |
| 3.3.2.2 | Kinínový systém..... | 25 |
| 3.3.3 | Hormonálne-neurogénna regulácia..... | 26 |
| 3.3.3.1 | Vegetatívny nervový systém..... | 26 |
| 3.3.3.2 | Katecholamíny..... | 27 |
| 3.3.3.3 | Acetylcholín | 29 |
| 3.3.3.4 | Serotonín | 30 |
| 3.3.3.5 | Vazopresín | 30 |
| 3.3.3.6 | Natriuretické peptidy | 31 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.4 | Polyfenoly | 32 |
| 3.4.1 | Flavonoidy..... | 32 |
| 3.4.1.1 | Biosyntéza flavonoidov | 33 |
| 3.4.1.2 | Metabolizmus flavonoidov | 34 |
| 3.4.1.3 | Kardiovaskulárne účinky flavonoidov..... | 35 |
| 3.4.2 | Kyselina 3-hydroxyfenyloctová..... | 36 |
| 4 | CIEĽ PRÁCE..... | 38 |
| 5 | EXPERIMENTÁLNA ČASŤ | 39 |
| 5.1 | Zvieratá | 39 |
| 5.2 | Použité vybavenie | 39 |
| 5.2.1 | Prístroje a pomôcky | 39 |
| 5.2.2 | Chemikálie | 39 |
| 5.3 | Metodika..... | 42 |
| 5.3.1 | Priebeh experimentu | 42 |
| 5.3.2 | Zhodnotenie nameraných dát | 46 |
| 6 | VÝSLEDKY | 47 |
| 7 | DISKUSIA | 54 |
| 8 | ZÁVER..... | 59 |
| 9 | POUŽITÁ LITERATÚRA | 60 |

1 ZOZNAM SKRATIEK

| | |
|------------------|--|
| 3-HPAA | kyselina 3-hydroxyfenyloctová |
| AA | kyselina arachidonová |
| AC | adenylátcykláza |
| ACE | angiotenzín konvertujúci enzým |
| ANP | atriálny natriuretický peptid |
| ATP | adenozíntrifosfát |
| | metyl 2,6-dimetyl-5-nitro-4-[2-(triflorometyl)fenyl]-1,4- |
| BAY K8644 | dihydropyridín-3-karboxylát |
| BH4 | tetrahydrobiopterín |
| BNP | mozgový natriuretický peptid |
| Ca ²⁺ | vápenaté ióny |
| cAMP | cyklický adenosínmonofosfát |
| cGMP | cyklický guanosínmonofosfát |
| CNP | natriuretický peptid typu C |
| CNS | centrálny nervový systém |
| COMT | katechol-O-metyltransferáza |
| COX | cyklooxygenáza |
| DA | dopamín |
| DAG | diacylglycerol |
| DOPA | dihydroxyfenylalanín |
| ECE | endotelín konvertujúci enzým |
| EDRF | endoteliálny relaxačný faktor |
| eNOS | endoteliálna syntáza oxidu dusnatého |
| ET-1 | endotelín 1 |
| ET-2 | endotelín 2 |
| ET-3 | endotelín 3 |
| FAD | flavínadenínindinukleotid |
| FMN | flavínmononukleotid |
| GTP | guanosíntrifosfát |
| IK _{Ca} | vápnikom aktivované draslíkové kanály so strednou vodivosťou |
| iNOS | inducibilná syntáza oxidu dusnatého |
| IP ₃ | inozitoltrifosfát |

| | |
|------------------|---|
| K ⁺ | draselné ióny |
| KVO | kardiovaskulárne ochorenia |
| KVS | kardiovaskulárny systém |
| L-NAME | N-nitroarginín metylester |
| MAO | monoaminoxidáza |
| MLCK | l'ahkoreťazcová myozínkináza |
| MP | l'ahkoreťazcová myozínfosfatáza |
| NA | noradrenalín |
| nNOS | neuronálna syntáza oxidu dusnatého |
| NO | oxid dusnatý |
| NOS | syntáza oxidu dusnatého |
| PGD2 | prostaglandín D2 |
| PGE2 | prostaglandín E2 |
| PGF2 | prostaglandín F2 |
| PGG2 | prostaglandín G2 |
| PGH2 | prostaglandín H2 |
| PGI2 | prostacyklín |
| PIP | fosfatidylinozitolfosfát |
| PKA | proteínkináza A |
| PKC | proteínkináza C |
| PKG | proteínkináza G |
| PLA2 | fosfolipáza A2 |
| PLC | fosfolipáza C |
| RAAS | renín-angiotenzín-aldosterónový systém |
| sGC | rozpustná guanylátcykláza |
| SK _{Ca} | vápnikom aktivované draslíkové kanály s malou vodivosťou |
| TRAM-34 | 1-[(2-chlorofenyl)-difenylmetyl]pyrazol |
| TXA2 | tromboxán A2 6,12,19,20,25,26-hexahydro-5,27:13,18:21,24-trieten-11,7- meteno-7H-dibenzo[b,m][1,5,12,16]tetraazacyklotrikozín-5-13- |
| UCL-1684 | diium |
| VNS | vegetatívny nervový systém |

2 ÚVOD

Kardiovaskulárny systém (KVS) prispieva k integrovanej funkcii celého organizmu. Roznáša k bunkám výživné látky a hormóny a odnáša od nich odpadné produkty. Pozostáva z pod systému krvných a lymfatických ciev (Junqueira *et al.* 1997). Prietok krvi tkanivami je regulovaný lokálnymi a celkovými homeostatickými mechanizmami, ktoré vyvolávajú dilatáciu alebo kontrakciu svaloviny ciev (Ganong 2005).

Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) sú hlavnou príčinou globálnej mortality a významne prispievajú k chorobnosti a predčasnej invalidite. Najčastejšími neovplyvniteľnými rizikovými faktormi vzniku KVO sú vek a pohlavie. Medzi ovplyvniteľné rizikové faktory patrí obezita, fajčenie, nadmerná konzumácia alkoholu či sedavý spôsob života. Naopak ako prevencia pôsobí zdravý životný štýl vrátane vhodnej stravy. (Ciumărnean *et al.* 2020, Klener *et al.* 2012, Dítě *et al.* 2007).

Flavonoidy sú látky s fenolovou štruktúrou nachádzajúce sa napr. v ovocí, zelenine, obilí, čaji či víne. Patria medzi prírodné polyfenoly známe pre svoje blahodarné účinky na zdravie (Panche *et al.* 2016). Významne sa podieľajú na prevencii KVO vďaka svojim antiaterogénnym, antitrombotickým a antioxidačným vlastnostiam. Štúdie ukázali, že flavonoidy dokážu modulovať aktivitu mnohých zápalových mediátorov. Predstavujú alternatívu vo vývoji nových liečiv (Ciumărnean *et al.* 2020). Táto práca sa zameriava na vazodilatačné účinky jedného z derivátov flavonoidov - kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej a overenie mechanizmu tohto účinku na koronárnych cievach metódou *ex vivo* na izolovanej koronárnej artérii prasaťa.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Kardiovaskulárny systém

Kardiovaskulárny systém ako jeden z kľúčových sústav spoločne s nervovou sústavou zjednocujú fungovanie celého ľudského organizmu. Úlohou KVS je neustála dodávka kyslíku a nutričných látok tkanivám organizmu a odvádzanie jeho spodín k exkretným orgánom. Okrem toho zaisťuje aj transport hormónov a protilátok, reguláciu telesnej teploty či udržanie homeostázy (Junqueira *et al.* 1997, Konrádová *et al.* 2000, Ganong 2005).

KVS je zložený z podsystemu krvných a lymfatických ciev (Junqueira *et al.* 1997). Lymfatický systém zahŕňa lymfatické cievy, ktoré z tkanivového moku prijímajú lymfu (miazgu) (Čihák 1997). Spočiatku tieto cievy začínajú ako slepé lymfatické kapiláry. Postupne dochádza k anastomóze a vznikajú väčšie cievy, ktoré vyúsťujú do systému krvných ciev a vyprázdňujú sa do veľkej žily v blízkosti srdca. Navracajú tým tkanivovú tekutinu do krvi.

Krvný systém sa skladá zo srdca a krvných ciev (Junqueira *et al.* 1997, Konrádová *et al.* 2000).

3.1.1 Cievny systém

Krvné cievy predstavujú uzavretý systém trubíc, vďaka ktorým prúdi krv po tele. Krv je do tohto systému čerpaná srdcom (Čihák 1997, Naňka a Elišková 2015).

3.1.1.1 Histológia ciev

Obečne sa stena každej cievy skladá z troch vrstiev – *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia*. Zastúpenie vrstiev je prispôbené svojou štruktúrou funkčným nárokom jednotlivých úsekov cievneho systému (Konrádová *et al.* 2000, Čihák 1997). Obecnú stavbu cievnej steny znázorňuje Obr. 1.

Tunica intima

Tunica intima je vnútorná vrstva cievnej steny tvorená dvomi vrstvami.

Bunky endotelovej vrstvy sú ploché, polygonálne, obvykle potiahnuté v smere toku krvi. Ploché jadro majú uložené v centrálnej časti bunky. Okrem toho, že vytvárajú nezmáčavý povrch, ktorý oddeľuje krv od cievy, majú aj antitrombotický účinok (bránia vzniku trombu a podporujú fybrinolýzu). Modulujú tiež prietok krvi pôsobením na hladkú svalovinu cievy tvorbou a sekréciou parakrinne pôsobiacich vazodilatačných (napr. oxid dusnatý) a vazokonstrikčných (napr. endotelín) látok

na základe hemodynamických a chemických podnetov (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997, Trojan *et al.* 2003).

Pod endotelom sa nachádza subendotelová vrstva, tvorená riedkym kolagénym väzivom, ktoré príležitostne obsahuje aj jednotlivé bunky hladkej svaloviny (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997).

Tunica media

Stredná vrstva *tunica media* sa skladá predovšetkým zo skrutkovito usporiadaných vrstiev hladkých svalových buniek, ktoré produkujú medzibunkovú hmotu. Zastúpený je v nej hlavne glykosaminoglykan chondroitinsulfát a proteoglykany obsahujúce tento glykosaminoglykan. Medzi hladkosvalovými bunkami sa nachádzajú rozptýlené elastické a kolagénové vlákna. Hlavne kolagén III. typu, ako typická bielkovina cievnej steny, je zodpovedný za involučné zmeny, teda starnutie cievy. Elastické vlákna vytvárajú v médii jemné blanky, v ktorých sú vytvorené fenestrácie zabezpečujúce prienik živín do hlbších oblastí cievnej steny. Elastické štruktúry koncentrujúce sa na hranici *tunica media* formujú *membrana elastica interna* a *membrana elastica externa*, čím oddeľujú *tunica media* od *tunica intima* a *tunica adventitia* (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997, Dylevský *et al.* 2000).

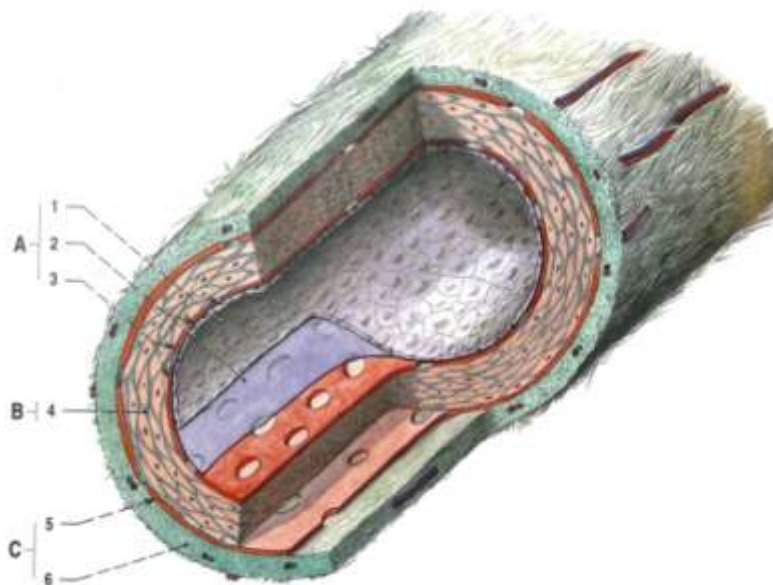
Tunica adventitia

Vonkajšia väzivová vrstva je tvorená pozdĺžne usporiadanými elastickými a kolagénymi vláknami, čím ju pružne fixujú. Obsahujú prevažne kolagén I. typu, glykosaminoglykany, dermatansulfát a v menšej miere heparansulfát. Prítomné sú tiež adipocyty, fibroblasty a aj bunky hladkej svaloviny. *Tunica adventitia* postupne prechádza do väziva orgánu, cez ktorý vedie cieva (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997, Čihák 1997).

3.1.1.2 Vaskularizácia a inervácia ciev

Drobným cievam je výživa steny zaistená difúziou z pretekajúcej krvi. Avšak cievy s priemerom väčším než 1 mm majú už steny relatívne silné, preto kyslík a prísun živín zabezpečuje systém vlastných ciev – *vasa vasorum*. Pochádzajú buď priamo z artérie, ktorú zásobujú, alebo z najbližšej susednej artérie. Tieto cievy sa masívne vetvia v *tunica adventitia* a vo vonkajších oblastiach *tunica media*. Častejšie sa však vyskytujú v stenách žíl než tepien, čo je pripisované nižšej koncentrácii kyslíka vo venóznej krvi (Konrádová *et al.* 2000, Čihák 1997).

Stena väčšiny krvných ciev, ktoré obsahujú bunky hladkej svaloviny, má mohutne vyvinutú sieť sympatických nemyelinizovaných vazomotorických nervových vlákien. Uvoľnenie mediátora noradrenalínu (norepinefrínu) vedie k vazokonstrikcii. Obecné eferentné nervy nevstupujú do *tunica media* tepien, preto musí NA difundovať ďalej, aby prenikol k bunkám hladkej svaloviny a mohol ich ovplyvniť. V žilách nájdeme nervové zakončenia v *tunica adventitia* aj *media*, ale inervácia je tu redšia než v tepnách. Tepny kostrového svalstva prijímajú tiež cholinergné vazodilatačné vlákna (mediátor acetylcholín) (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997).



Obr. 1 Obecná stavba cievnej steny

A – *tunica intima*: 1 – endotel, 2 – subendotelová vrstva, 3 – membrana elastica interna;
 B – *tunica media*: 4 – hladká svalovina; C – *tunica adventitia*: 5 – membrana elastica externa,
 6 – väzivo s vasa vasorum

Prevzaté z: Čihák (1997)

3.1.1.3 Typy krvných ciev

Pri krvných cievach rozlišujeme artérie (tepny) vetviace sa na tenké arterioly, ktoré prechádzajú do kapilár (vlásočníc). Tie potom pokračujú a formujú tenké venuly, ktoré sa zbierajú do vén (žil) (Čihák 1997).

Artérie a arterioly

Tepny privádzajú okysličenú krv do tkanív. Majú pevné a pružné steny, ktoré odolávajú pravidelným zmenám krvného tlaku. Krv nimi preteká rýchlo, postupným vetvením však rýchlosť klesá. Artérie sú väčšinou uložené hlbšie, ak sú však blízko

povrchu, tlaková vlna prechádzajúca artériou rozťahuje jej steny a vytvára hmatateľný tep (Junqueira *et al.* 1997, Čihák 1997).

Väčšina artérií v tele je muskulárneho typu. Sú to prevažne tepny orgánov, ako koronárne tepny srdca, tepny obličiek a pod. Majú stenu upravenú tak, aby prevažujúcou zložkou bola *tunica media*, ktorá môže obsahovať až 40 vrstiev buniek hladkej svaloviny. Táto svalovina usmerňuje prívod krvi orgánom. Smerom do periférie sila steny a priesvit tepny postupne klesajú (Dylevský *et al.* 2000, Naňka a Elišková 2015, Junqueira *et al.* 1997).

Pri artérií elastického typu prevažuje nad bunkami hladkého svalstva elastické väzivo. Vysoký obsah elastínu v *tunica media* spôsobuje žltkavé sfarbenie týchto ciev. Elastická zložka bráni tomu, aby sa cieva pri zahnutí zalomila a aby sa zastavil krvný obeh. Medzi artérie tohto typu patrí aorta a jej hlavné vetvy (Junqueira *et al.* 1997, Dylevský *et al.* 2000).

Aorta (srdcovnica), najväčšia ľudská tepna, rozvádza krv z ľavej komory do celého tela pomocou vetviacich sa tepien. Je tvorená tromi úsekmi. Prvý úsek *aorta ascendens* pokračuje ako *arcus aortae*. Odtiaľ začína tretí úsek *aorta descendens* rozdelený na *aorta thoracica* a *aorta abdominalis* (Čihák 1997).

Najtenšie artérie sa nazývajú arterioly. Obecne majú priemer menší než 0,5 mm a úzky priesvit, ktorý ale dokážu svojou svalovinou meniť. Okrem hladkej svaloviny ich stena obsahuje aj elastické tkanivo. Koncové úseky arterioli tvoria prekapiláry, tie pokračujú do kapilár (Čihák 1997, Junqueira *et al.* 1997).

Kapiláry

Kapiláry (vlásočnice) sa skladajú z jednej vrstvy polygonálnych endotelových buniek, ktoré sa stáčajú a vytvárajú tým cylindrický priestor. Túto vrstvu na rôznych miestach obklopujú bunky s dlhými cytoplazmatickými výbežkami – pericyty. Ich cytoplazma obsahuje aktín, myozín a tropomyozín, čo značí schopnosť určitej kontrakcie (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997).

Priemer kapilár kolíše od 7 do 9 μm . Prechod medzi terminálnou arterioulou a kapilárou obsahuje prekapilárny sfinkter, ktorý kontrakciou a dilatáciou reguluje prietok krvi kapilárnym riečiskom. Jeho funkcia je riadená nervovo, endokrinne a lokálnymi produktmi tkaniva, ako je histamín. Tok krviniek kapilármi je pomalý, pretože veľkosť priesvitu kapiláry zodpovedá veľkosti erytrocytov (Dylevský *et al.* 2000, Naňka a Elišková 2015, Junqueira *et al.* 1997).

Vlásočnice plnia tri základné úlohy. Slúžia ako selektívne prestupná membrána pre látkovú výmenu medzi krvou a tkanivom, plnia protizrážanlivú funkciu (zabraňujú koagulácii) a metabolizujú celý rad látok (lipoproteíny, prostaglandíny a i.). Metabolická aktivita tkaniva odráža hustotu kapilárnej siete. Bohatú sieť majú orgány s vysokou úrovňou metabolizmu, napr. obličky a pečeň. Naopak pomerne málo kapilár obsahuje hladká svalovina a tuhé väzivo (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997, Dylevský *et al.* 2000).

Podľa štruktúry endotelových buniek a prítomnosti bazálnej laminy rozdeľujeme kapiláry do štyroch skupín. Delíme ich na kapiláry so súvislou endotelovou výstelkou, kapiláry fenestrované, kapiláry s pórmami a kapiláry sinusoidné.

Súvislé kapiláry (somatického typu) sú lemované endotelovými bunkami bez prítomných fenestrácií a pórov. V cytoplazme týchto buniek nájdeme pinocytárne vaky zabezpečujúce obojsmerný transport makromolekúl bunkou. Bazálna membrána je kontinuálna. Tento typ kapilár nachádzame na všetkých typoch svalov, vo väzive, v exokrinných žľazách či v nervovom tkanive.

Fenestrované kapiláry (viscerálneho typu) majú v stenách endotelových buniek vytvorené fenestrácie s priemerom 60 - 80 nm. Uzatvára ich tenká priehradka – diafragma. Bunky obklopuje celistvá bazálna membrána. Tieto kapiláry sú typické pre miesta s rýchlou látkovou výmenou ako sú črevá, obličky a endokrinné žľazy.

Kapiláry s pórmami majú v endotelových bunkách vytvorené póry, ktoré ale neuzatvára diafragma. Majú súvislú bazálnu membránu a nachádzame ich v glomeruloch obličiek.

Sinusoidné kapiláry majú nepravidelný lumen, fenestrácie v endotelovej stene bez diafragmy a nesúvislú bazálnu membránu. Táto štruktúra steny významne uľahčuje výmenu látok. V okolí týchto kapilár sa vyskytujú makrofágy. Sinusoidy nájdeme v pečeni a v hematopoetických orgánoch ako sú kostná dreň a slezina (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997).

Na konci kapilárneho riečiska prechádzajú kapiláry do postkapilár, ktoré potom pokračujú do venul a žíl (Čihák 1997).

Venuly a vény

Venuly sú najtenšie žily s priemerom 0,2 - 1 mm. Charakterizuje ich *tunica intima* tvorená endotelom a tenkou subendotelovou vrstvou, stredná *tunica media* neobsahujúca žiadne alebo len pár vrstiev hladkej svaloviny, a najsilnejšia *tunica adventitia* tvorená väzivom bohatým na kolagénne vlákna. Všetky venuly majú oproti

zhodným arteriolám slabšiu stenu a niektoré sa funkčnými vlastnosťami podobajú kapilárom. Postupne sa zbierajú do žíl (Čihák 1997, Junqueira *et al.* 1997, Dylevský *et al.* 2000).

Štruktúra steny žíl významne závisí na lokalizácii cievy v ľudskom tele. Majú väčšinou dobre vyvinutú *intimu*. Slabá *tunica media* s niekoľkými vrstvami hladkej svaloviny prechádza do najširšej vrstvy *tunica adventitia*. Niektoré veľké žily, ktoré ležia pod úrovňou srdca, majú v tejto vrstve zväzky pozdĺžne usporiadaných buniek hladkého svalstva. Svalovina zosilňuje stenu, bráni jej distenzii a umožňuje antigravitačné čerpanie krvi smerom do srdca (Dylevský *et al.* 2000, Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997).

Malé a stredne veľké žily na rozdiel od tepien obsahujú vo vnútri párové alebo aj nepárové chlopne. Sú to vreckovité záhyby *tunica intima* obsahujúce elastické väzivo lemované po oboch stranách endotelom. Vyskytujú sa predovšetkým v žilách končatín, kde usmerňujú žilnú krv do srdca (Naňka a Elišková 2015, Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997).

Z funkčného hľadiska vytvárajú žily rezervoár, v ktorom je permanentne asi 70% objemu všetkej krvi. Krv v žilách prúdi pomaly, čo je spôsobené aj tým, že krv už nepoháňa sila srdca. Pohyb žilnej krvi je závislý na aktivite a činnosti tela. Zabezpečujú ho kontrakcie okolitých kostrových svalov, motilita steny dutých orgánov, pulzová vlna tepien a tlakové zmeny spôsobené dýchacími pohybmi (Dylevský *et al.* 2000, Čihák 1997).

3.2 Hladký cievny sval

Každému mnohobunkového organizmu zabezpečuje svalové tkanivo mnoho funkcií. Je zložené z diferencovaných buniek obsahujúcich kontraktilné proteíny. Tie sú biologicky prispôbené k vyvolaniu sily potrebnej ku kontrakciám buniek, ktoré potom umožňujú pohyb orgánov i celého tela, zúčastňujú sa pri dýchaní, prijímaní potravy, rozmnožovaní a komunikácií. Na základe morfológického a funkčného charakteru delíme svalové tkanivo do troch skupín – svalstvo kostrové, srdcové a hladké. Každé z nich je štruktúralne prispôbené svojej fyziologickej úlohe (Dylevský *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997).

Hladká svalovina tvorí steny útrob a všetkých ciev okrem kapilár. Anatomicky sa od kostrového a srdcového svalstva líši absenciou viditeľného priečneho pruhovania. Skladá sa z pretiahnutých buniek obklopených bazálnou laminou a sieťou

retikulárnych vláken, ktoré usmerňujú silu vznikajúcich sťahov a zaisťujú ich synchronizovanú akciu, napr. črevnú peristaltiku (Junqueira *et al.* 1997, Ganong 2005).

Bunky hladkej svaloviny (leiomyocyty) majú vretenovitý tvar – najsilnejšie sú v strede a smerom ku koncom sa zužujú. Ich najbežnejšia dĺžka je 80 μm . V najširšom úseku bunky je uložené jedno tyčinkovité jadro, pri ktorého póloch nachádzame väčšinu organel. Aby bola svalovina čo najviac konzistentná, hladké svalové bunky sa ukladajú paralelne vedľa seba a to tak, že zúžená časť jednej bunky prilieha k najširšej časti vedľajšej bunky (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997, Dylevský *et al.* 2000).

Všetky svalové bunky sú chránené povrchovou membránou (sarkolémou). Na jej povrchu sa nachádza množstvo bunkových receptorov. K sarkoléme sú z vnútornej strany pripojené platničky, tzv. denzné telieska. Sú to oválne štruktúry obsahujúce α -aktínín, ktorý viaže aktínové vlákna. Okrem sarkolémy sa denzné telieska vyskytujú aj cytoplazme (sarkoplazme) buniek. Plnia obdobnú funkciu ako Z-línie v sarkomerách kostrového svalstva. Utvárajú sieť, čím zabezpečujú rovnomernú kontrakciu (Konrádová *et al.* 2000, Trojan *et al.* 2003, Rokyta 2000).

V sarkoplazme ďalej nachádzame jemné myofibrily skladajúce sa z kontraktálnych bielkovín – aktínu a myozínu. Na rozdiel od kostrovej svaloviny nie sú usporiadané parakryštalicky, a tak je kontrakcia výsledkom ich vzájomného posunu. Dochádza k nej pomalšie, ale má dlhšie trvanie. Hladký sval obsahuje aj tropomyozín, troponín ale chýba (Dylevský *et al.* 2000, Ganong 2005).

Hladké svalstvo je riadené autonómnyimi nervami (sympatikus a parasympatikus) a látkami typu tkaninových hormónov (napr. estrogény, oxytocín, vazopresín). Reaguje aj na mechanické podnety ako je napínanie steny dutých orgánov (Dylevský *et al.* 2000, Čihák 2011).

Okrem schopnosti kontrakcie vykazujú bunky hladkej svaloviny aj sekrečnú aktivitu. Sú schopné syntetizovať kolagén typu III, elastín, proteoglykany a iné extracelulárne produkty. Zvyčajne je ale sekrečná aktivita buniek malá (Konrádová *et al.* 2000, Junqueira *et al.* 1997).

Existujú podstatné rozdiely v štruktúre a funkcii hladkých svalov vzhľadom na ich lokalizáciu v tele. Všeobecne ich delíme na útrobné hladké svaly a viacjednotkové hladké svaly (Ganong 2005).

Útrobný hladký sval obsahuje nízkoodporové mostíky medzi jednotlivými svalovými bunkami, a preto sa chovajú ako jeden komplex (syncýtium). Obvykle sú to stovky buniek, ktoré sa takto súčasne kontrahujú. Mostíky sú spojené v miestach splývania membrán dvoch buniek a vytvárajú gap junctions. Útrobný hladký sval nachádzame predovšetkým v stenách dutých orgánov (svalovina čriev, maternice a i.) .

Viacjednotkový hladký sval má buď prepojený iba malý počet buniek alebo sa tu gap junctions vôbec nevyskytujú. Táto svalovina má schopnosť jemne odstupňovať pohyb. Nachádza sa v štruktúrach ako je dúhovka v oku alebo riasnaté teleso. Funkčne sa podobá kostrovému svalstvu (Čihák 2011, Ganong 2005, Trojan *et al.* 2003).

Hladké svalstvo je neustále v stave určitej kontrakcie, má napätie (tonus). Prakticky nepodlieha únave. Hladké svalové bunky majú schopnosť sa mitoticky deliť, vďaka čomu sa tkanivo dokáže regenerovať (Čihák 2011, Konrádová *et al.* 2000).

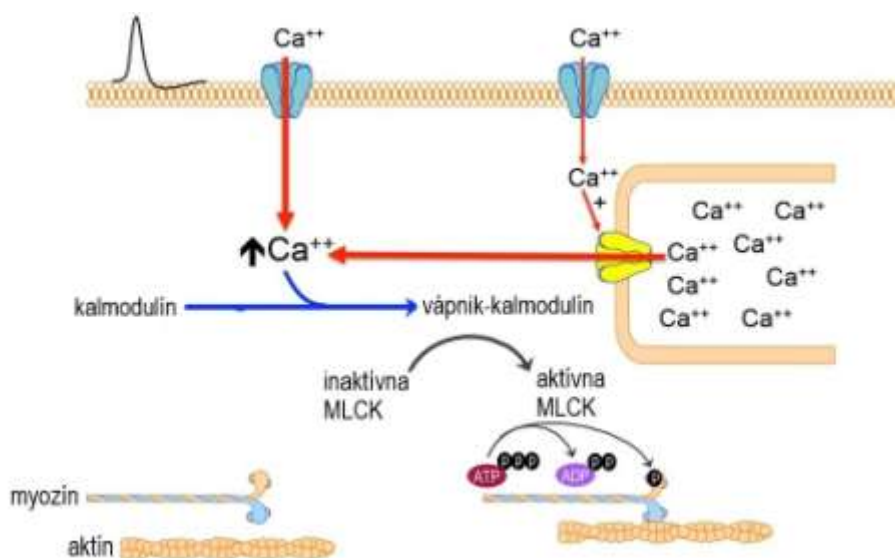
3.2.1 Mechanizmus kontrakcie hladkého svalu

Kontrakcia hladkého svalu je iniciovaná influxom iónov vápnika (Ca^{2+}) do cytosolu bunky. Rast intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} zabezpečuje zvýšený vstup vápnika z extracelulárnej tekutiny napäťovo riadenými kalciovými kanálmi a v menšej miere uvoľnenie vápnika zo sarkoplazmatického retikula bunky. Okrem neho sa podieľajú na regulácii a ukončení kontrakcie aj iné organely vycytávajúce Ca^{2+} , napr. mitochondrie. Hladinu Ca^{2+} takisto ovplyvňujú aj regulačné proteíny kalmodulín, kaldesmon a kalpodín (Trojan *et al.* 2003, Ganong 2005, Fontana *et al.* 2014).

Po zvýšení koncentrácie Ca^{2+} sa vápnik viaže na kalmodulín, ktorý funkčne nahradzuje troponín. Výsledný komplex vápnik-kalmodulín aktivuje kalmodulín-dependentnú ľahkoreťazcovú myozínkinázu (MLCK). MLCK katalyzuje fosforyláciu myozínových reťazcov, čo vedie k aktivácii myozínovej ATPázy. Aktín tak môže interagovať s myozínom a zahájiť kontrakciu (Obr. 2) (Kittnar 2011, Ganong 2005).

Pri poklese Ca^{2+} koncentrácie dochádza k uvoľneniu kalciových iónov z kalmodulínu. To umožňuje enzýmu ľahkoreťazcovej myozínfosfatáze (MP) odštiepenie fosfátu z myozínovej hlavy, ktorý tam naviazala MLCK. Funkciu MP inaktivuje jej fosforylácia pomocou Rho-kinázy. Ukončuje sa kontrakcia. Intracelulárny vápnik sa odčerpáva z cytoplazmy pomocou kalciovej pumpy v membráne bunky a nastáva relaxácia. Kalciová pumpa funguje podstatne pomalšie než u kostrových svalov, preto

kontrakcia pretrváva o niekoľko sekúnd dlhšie (Kittnar 2011, Ganong 2005, Rokyta 2000).



Obr. 2 Mechanizmus kontrakcie hladkého svalu

Prevzaté a upravené z: Deng (2001)

3.3 Regulácia vazokonstrikcie a vazodilatácie

Riadenie krvného obehu sa nepretržite vyrovnáva s rôznymi zmenami a požiadavkami metabolizmu. Musí byť zaistené kontinuálne prekrvenie jednotlivých tkanív a orgánov a tiež neustály tok krvi správnym smerom, aby sa udržiaval minútový srdcový výdaj a tlak krvi v obehu. Preto sa vyvinuli kardiovaskulárne regulačné mechanizmy špecializované na zabezpečovanie týchto potrieb za každých okolností. Podľa oblasti pôsobenia ich delíme na lokálne a centrálné (Kittnar 2011, Trojan *et al.* 2003, Ganong 2005).

Lokálne (miestne) regulačné mechanizmy udržujú konštantný prietok krvi tkanivom (aj pri zmene tlaku), zachovávajú jeho lineárnu rýchlosť a hlavne ho prispôbujú metabolickým nárokom daného tkaniva. Hladká svalovina arteriol reaguje na lokálne podnety. Obvykle sa tento mechanizmus vzhľadom k svojej úlohe v miestnom riadení vlastného prietoku nazýva aj autoregulácia.

Hlavnou náplňou centrálnych (celkových) regulačných mechanizmov je udržanie stáleho tlakového gradientu, aby bol zachovaný tok krvi v cievach. Zabraňujú zmene periférneho odporu a tlaku krvi tým, že upravujú prievit ciev v ostatných oblastiach obehového systému a činnosť srdca. Hladká svalovina arteriol reaguje na podnety z ústredia celkových regulačných mechanizmov v mozgovom kmeni.

Obidva typy mechanizmov nachádzame vo všetkých tkanivách. Ich význam sa však líši v závislosti na lokalizácii jednotlivých tkanív. Lokálne riadenie je dominantné v myokarde a v mozgu, centrálné riadenie je rozhodujúce pre kožu alebo v splachnickej oblasti.

Do lokálnych mechanizmov radíme endotelovú a enzymatickú reguláciu, do centrálnych mechanizmov hormonálne-neurogénnu reguláciu (Kittnar 2011, Trojan *et al.* 2003).

3.3.1 Endotelová regulácia

Vaskulárny endotel ako dynamický endokrinný orgán reguluje kontraktilné a sekretorické aktivity cievnej steny a hemodynamické procesy vo vnútri cievy. Vylučuje vazoaktívne látky a rastové faktory ako odpoveď na zmeny v prietoku krvi, tenzii kyslíka a ďalšie stimuly prostredníctvom receptorov. Vazoaktívne látky zahŕňajú oxid dusnatý (NO), prostanoidy a endotelíny (Ganong 2005, Masopust 2003).

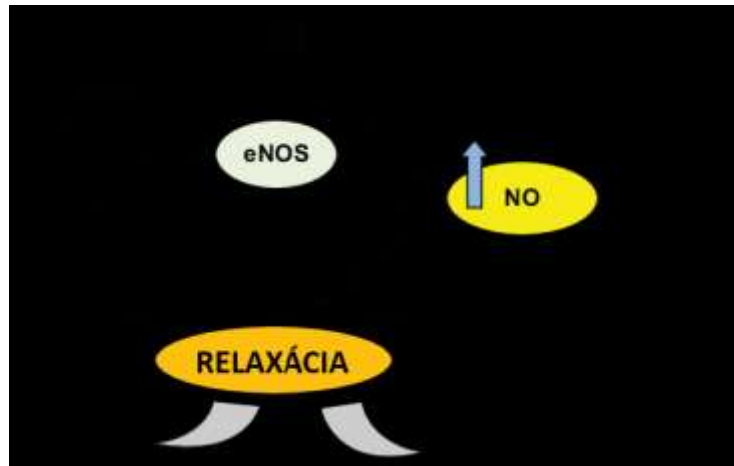
3.3.1.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je rozpustný plyn nepretržite syntetizovaný endotelom. Predtým, než bol identifikovaný ako NO, bol označovaný ako endoteliálny relaxačný faktor (EDRF). Táto signálna molekula má široké spektrum vlastností, ktoré udržiavajú vaskulárnu homeostázu (Ganong 2005, Cannon 1998).

NO vzniká z aminokyseliny arginínu reakciou katalyzovanou syntázou oxidu dusnatého (NOS). Molekuly NOS obsahujú rad kofaktorov - tetrahydrobiopterín (BH₄), thiol, flavínadenínindinukleotid (FAD) a flavínmononukleotid (FMN). Existujú tri izoformy NOS. Dve konštitutívne formy – neuronálna NOS (nNOS) a endotelová NOS (eNOS) a jedna indukibilná forma NOS (iNOS). Tieto izoformy vykazujú expresiu špecifickú pre typ bunky a tkaniva. nNOS je exprimovaný v bunkách centrálného a periférneho nervového systému, iNOS sa vyskytuje v makrofágoch a iných bunkách imunitného systému a nakoniec eNOS, ktorý je primárne exprimovaný v endotele buniek. Má dôležité biologické funkcie, a to hlavne reguláciu prietoku krvi a tonusu ciev. nNOS a eNOS sú aktivované látkami zvyšujúcimi intracelulárnu koncentráciu Ca²⁺ (vrátane vazodilatačného acetylcholínu a bradykinínu). iNOS je aktivovaná cytokínmi (Ganong 2005, Tenopoulou *et al.* 2020).

NO nepôsobí na bunku, ktorá ho syntetizuje, ale difunduje cytoplazmatickou membránou do najbližších buniek hladkej svaloviny. Tie prijímajú NO, ktorý potom

aktivuje rozpustnú guanylátcyklázu (sGC), čo spôsobuje zvýšenie koncentrácie cyklického guanozínmonofosfátu (cGMP) z guanozíntrifosfátu (GTP). cGMP je druhý posol, ktorý aktivuje proteínkinázu G (PKG) a prostredníctvom fosforylácie ďalších proteínov dochádza k zníženiu intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} a k vazodilatácií ciev. Schématicky znázornená syntéza NO na obrázku 3.



Obr. 3 Schéma syntézy oxidu dusnatého

Prevzaté a upravené z: Toblli *et al.* (2012)

K vazodilatácií môže dochádzať aj nezávisle na cGMP. Aktivácia K^+ -kanálov oxidom dusnatým vedie k efluxu iónov draslíka a tým k hyperpolarizácií membrány, čím nastáva relaxácia. NO tiež priamo S-nitrozyláciou aktivuje vnútrobunkovú ATPázu SERCA.

NO je inaktivovaný hemoglobínom (Ganong 2005, Tenopoulou *et al.* 2020, Alderton *et al.* 2001).

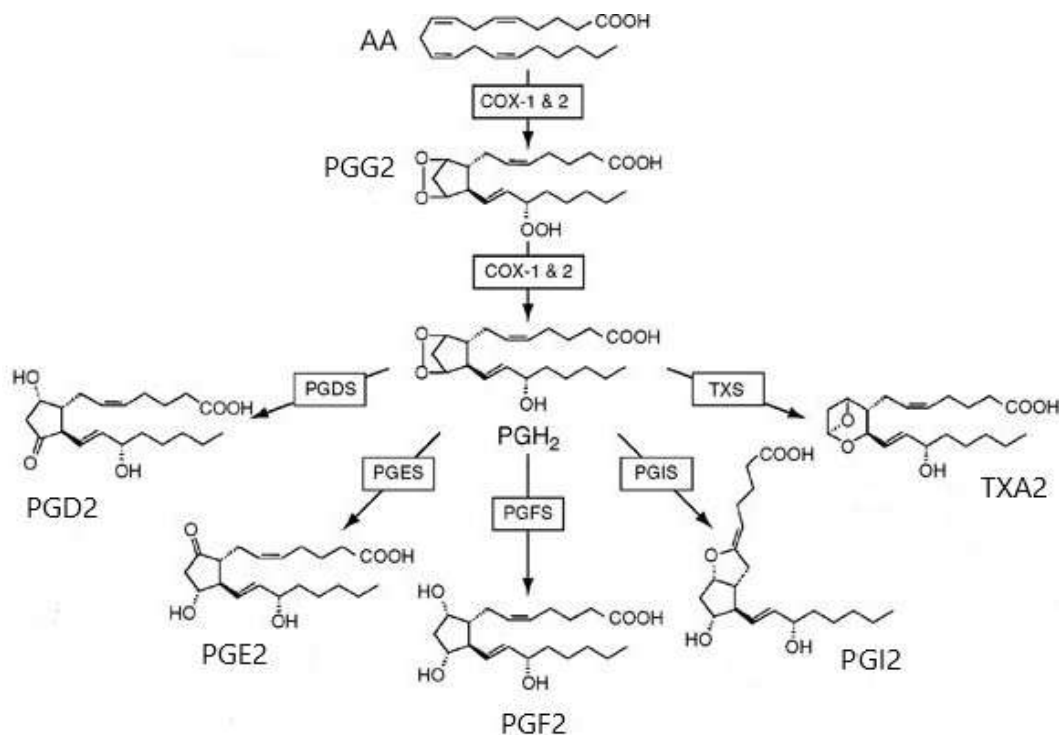
Okrem toho, že NO relaxuje cievy a ovplyvňuje tak krvný tlak, vykazuje antitrombotické, antiaterosklerotické a protizápalové účinky. Je dôležitý pre cytotoxickú aktivitu makrofágov (vrátane ich schopnosti ničiť rakovinné bunky), dilatuje hladkú svalovinu v tráviacom systéme a pri uvoľnení NO nervovými zakončeniami penisu spôsobuje roztiahnutie jeho ciev a erekciu (Ganong 2005, Zhao *et al.* 2015).

3.3.1.2 Prostanoidy

Eikosanoidy sú zlúčeniny, ktoré sú odvodené od nenasýtených mastných kyselín s reťazcom dlhým 20 uhlíkov. Delia sa na prostanoidy a leukotrieny. Medzi prostanoidy radíme prostaglandíny, prostacyklíny a tromboxany. Tieto deriváty môžu

ovplyvňovať funkcie buniek endotelu a hladkého svalstva ciev (Ganong 2005, Imig 2020).

Syntéza prostanoïdov začína uvoľnením ich prekursoru kyseliny arachidonovej (AA) z fosfolipidov pomocou enzýmu fosfolipázy A2 (PLA2). AA sa konvertuje na prostaglandín G2 (PGG2) pomocou enzýmov cyklooxygenáz (COX), hlavne COX-1 a COX-2. PGG2 sa peroxidáciou mení na prostaglandín H2 (PGH2). Z neho prostredníctvom enzýmov prostanoïdsyntáz potom vznikajú prostaglandín E2 (PGE2), prostacyklín (PGI2), prostaglandín D2 (PGD2), prostaglandín F2 (PGF2) a tromboxán A2 (TXA2) (Ganong 2005, Ozen *et al.* 2017). (Obr. 4)



Obr. 4 Syntéza prostanoïdov z kyseliny arachidonovej

Prevzaté a upravené z: Breyer (2008)

Prostaglandíny produkujú bunky endotelu i hladkého svalstva v cievach. PGE2 pôsobí vo všeobecnosti ako vazodilatátor väzbou na EP₂ receptor, ktorý je spojený s Gs-proteínovou dráhou. PGF2 bežne vyvoláva vazokonstrikciu stimuláciou Gq-proteínovej dráhy. PGI2, ako primárny derivát AA, je produkovaný vaskulárnym endotelom. Je silný vazodilatátor a inhibítor adhézie trombocytov k endotelu. Viazá sa na IP receptor spojený s Gs-proteínovou dráhou. Aby nastala relaxácia, receptory EP₂ a IP musia aktivovať adenylátcyklázu (AC), ktorá zabezpečuje premenu adenozintrifosfátu (ATP) na cyklický adenozinmonofosfát (cAMP). Tým dochádza k aktivácii proteínkinázy A (PKA), ktorá fosforyluje MLCK, čím ju deaktivuje

a zabraňuje interakcií medzi aktínom a myozínom vedúcej k vazokonstrikcii. Okrem toho blokuje uvoľnenie Ca^{2+} zo sarkoplazmatického retikula, aktivuje jeho spätné vychytávanie ATPázou SERCA a aktivuje eflux K^+ najmä cez BK_{Ca} a K_V kanály, čo vedie k hyperpolarizácii membrány a relaxácii hladkého svalu ciev (Klabunde 2009, Simmons *et al.* 2004, Tanaka *et al.* 2004, Štejfa *et al.* 1995).

Krvné doštičky produkujú TXA_2 , ktorý je silný vazokonstriktor pôsobiaci prostredníctvom TP receptoru spojeného s Gq-proteínovou dráhou. Ten stimuluje fosfolipázu C (PLC), ktorá hydrolyzuje fosfatidylinozitolfosfát (PIP) na diacylglycerol (DAG) a inozitoltrifosfát (IP_3), čo vedie k aktivácii proteínkinázy C (PKC) a k akumulácii intracelulárneho Ca^{2+} . Dochádza k vazokonstrikcii, ktorá uľahčuje biosyntézu ďalšieho TXA_2 a agregáciu trombocytov. Oproti predchádzajúcim predpokladom je dnes známe, že TXA_2 vzniká tiež v bunkách endotelu, prinajmenšom v prípade hypertenzie (Rucker *et al.* 2022, Klabunde 2009).

Prostanoidy okrem účinku na hladkú svalovinu ovplyvňujú mnoho ďalších fyziologických a patologických dejov naprieč celým organizmom. Zvyšujú prietok krvi srdcom, obličkami a mezenterickou oblasťou. Pôsobia ako cytoprotektíva žalúdočnej sliznice, znižujú sekréciu kyseliny chlorovodíkovej a vznik peptických vredov. Majú tiež uterotonický účinok – podporujú kontrakcie maternice. Sú dôležitými mediátormi zápalu a uplatňujú sa pri rozvoji astma bronchiale (Lincová 2007).

3.3.1.3 Endotelín

Bunky endotelu môžu produkovať kontrakčné peptidy tvorené 21 aminokyselinami – endotelíny. Patria medzi jeden z najúčinnějších faktorov, ktoré kontrolujú vaskulárny tonus. Vznikajú z prehormónu veľkého endotelínu (Big-ET-1) vďaka endotelín konvertujúcemu enzýmu (ECE). Rozoznávame 3 endotelíny. Najdôležitejší je endotelín 1 (ET-1) nachádzajúci sa v endotelových bunkách, mozgu a obličkách, ďalej endotelín 2 (ET-2) tvorený v črevách a obličkách a endotelín 3 (ET-3) prítomný v krvi a vo vysokých koncentráciách v mozgu, obličkách a tráviacom systéme (Ganong 2005, Lüscher *et al.* 1995).

V bunkách hladkého svalstva ciev sa ET-1 viaže na svoje špecifické receptory ET_A a ET_B spojené s Gq-proteínovou dráhou, ktoré aktivujú PLC, čo vedie k tvorbe IP_3 a DAG. To zapríčiní zvýšenie intracelulárnych hladín Ca^{2+} a následne premenu MLCK na svoju aktívnu formu. Vytvorí sa mostíky medzi aktínom a myozínom a dochádza k vazokonstrikcii. V niektorých krvných cievach je endotelínový receptor spojený s napäťovo ovládanými vápníkovými kanálmi pomocou Gi-proteínu.

Receptory ET_B, ktoré sú umiestnené v endotele ciev a nie v bunkách hladkého svalstva, sprostredkujú uvoľnenie NO a PGI₂, čo vyvolá vazodilatáciu (Lüscher *et al.* 1995, Klabunde 2009).

ET-1 má široký rozsah biologických účinkov okrem jeho priamych účinkov na vaskulárny tonus. Pri nízkych koncentráciách, ktoré nemajú priamy vazokonstrikčný účinok, ET-1 zosilňuje účinok iných vazokonstrikčných agonistov. Zohráva úlohu aj v patogenéze niektorých KVS chorobných stavov, vrátane renálnej ischemie, určitých typov hypertenzie či subarachnoidálneho krvácania (Lüscher *et al.* 1995, La *et al.* 1995).

3.3.2 Enzymatická regulácia

3.3.2.1 Systém renín-angiotenzín-aldosterón

Renín-angiotenzín-aldosterónový systém (RAAS) je životne dôležitý systém ľudského tela udržiavajúci koncentráciu sodíka v plazme, arteriálny krvný tlak a extracelulárny objem. Ako napovedá názov, renín a angiotenzín sú dve kritické zložky tvoriace tento systém. (Patel *et al.* 2017).

Renín je syntetizovaný ako preprorenín v juxtaglomerulárnych epiteloidných bunkách, kde sa štiepi na prorenín a ďalej sa spracováva na aktívny renín uložený v granulách. K zvýšenej syntéze a uvoľňovaniu renínu dochádza pri:

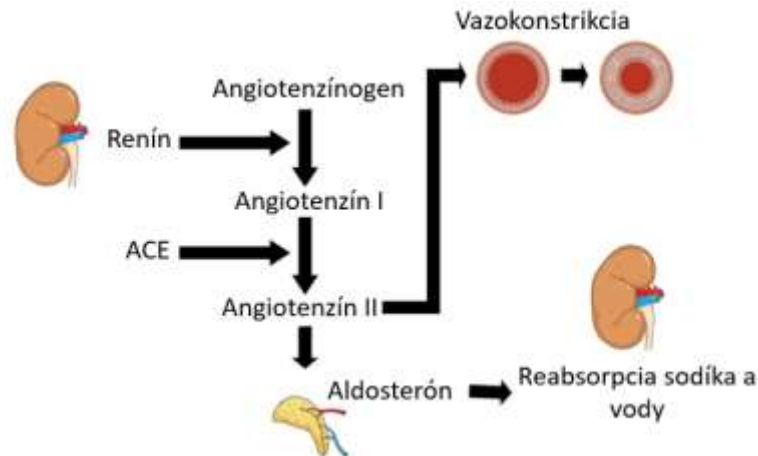
- 1) aktivácií sympatiku cez β_1 adrenoreceptory
- 2) hypotenzii renálnej artérie spôsobenou systémovou hypotenziou alebo stenózou renálnej artérie
- 3) znížení dodávky sodíka do distálnych tubulov obličiek.

V obehu renín odštiepuje angiotenzín I z angiotenzínogenu. Angiotenzín konvertujúci enzým (ACE), ktorý sa uvoľňuje z endotelových buniek, premieňa angiotenzín I na angiotenzín II. Angiotenzín II pôsobí na dva receptory – AT1 a AT2.

Pôsobením na AT1 dochádza k zvýšenej retencii sodíka, priamej vazokonstrikcii (aktiváciou PLC a kaskádou IP₃ a DAG), stimulácií smädu a chuti na soľ, zvýšenej aktivite sympatického nervového systému a uvoľňovaniu aldosterónu z kôry nadobličiek. Aldosterón, ako konečný hormón RAAS, vykonáva 90% mineralokortikoidnej aktivity sekrécie nadobličiek a je hlavným regulátorom rovnováhy sodíka, draslíka a telesných tekutín. Pôsobením cez mineralokortikoidný receptor moduluje aldosterón expresiu iónových kanálov, púmp a výmenníkov v tkanivách epitelu. To vedie k zvýšeniu reabsorpcie sodíka a vody a k vylučovaniu

draslíka. Výsledkom je zväčšenie objemu cirkulujúcej krvi, čím sa zvyšuje krvný tlak. (Obr. 5) Endoteliálne receptory AT1 by prekvapivo mohli fungovať ako mechanoreceptory.

Stimulácia AT2 má opačný efekt ako AT1. Vede k protizápalovým, antifibrotickým a vazodilatačným účinkom. AT2 je dominantný typ receptoru plodu a hrá kľúčovú rolu v jeho vývoji (Ames *et al.* 2019, Patel *et al.* 2017, Klabunde 2009).



Obr. 5 Schéma systému renín-angiotenzín-aldosterón

Prevzaté a upravené z: Vargas-Rodrigues *et al.* (2022)

RAAS nie je regulovaný len renínom, ale je modulovaný tiež natriuretickými peptidmi uvoľňovanými srdcom. Pôsobia ako dôležitý protiregulačný systém (Klabunde 2009).

3.3.2.2 Kinínový systém

Biologicky aktívne kiníny sú peptidové mediátory s krátkou životnosťou, ktoré vznikajú enzymatickým pôsobením kalikreínov na prekuzory kininogény. Aktivácia tohto systému je dôležitá najmä pri regulácii krvného tlaku a pri zápalových reakciách (Howl *et al.* 2003).

Bradykinín patrí k najvýznamnejším zástupcom kinínov. Vzniká z kalidínu pomocou enzymatického pôsobenia plazmatickej aminopeptidázy. Úloha bradykinínu spočíva predovšetkým vo vazodilácii cievnej svaloviny. Zvyšuje cievnu priepustnosť, znižuje krvný tlak, zvyšuje sekréciu katecholamínov a stimuluje kontrakciu viscerálnej svaloviny. Stimuláciou nervových zakončení dokáže indukovať bolesť. Je mediátor zápalu.

Tieto účinky sú sprostredkované špecifickými receptormi B1 a B2 spojenými s G proteínom. B1 receptory majú obmedzenú distribúciu a majú význam pri zápale. V endotele sa bradykinín viaže na B2 receptor spojený s Gq-proteínovou dráhou.

Nasleduje kaskáda IP_3 a DAG, zvýšenie koncentrácie vápenatých iónov a dochádza k aktivácii eNOS a PLA2. Dôsledkom je vazodilatácia hladkého svalstva spôsobená uvoľnením NO a prostacyklínu.

Degradácia bradykinínu je zabezpečená pomocou kinináz. Najúčinnější je kinináza II zhodná s ACE, ktorý okrem bradykinínu štiepi aj angiotenzín I (Walker et al. 1995, Golias et al. 2007).

3.3.3 Hormonálne-neurogénna regulácia

3.3.3.1 Vegetatívny nervový systém

Autonómny alebo vegetatívny nervový systém (VNS) je spolu so somatickým systémom súčasťou periférneho nervového systému. Je to systém neovládateľný vôľou a tvorí ho samostatná skupina periférnych nervov. Má dôležitú úlohu pri regulácii vnútorného prostredia organizmu, inervuje hladké svalstvo ciev, tráviacej trubice, endokrinné a exokrinné žľazy.

VNS sa delí na dva samostatné funkčné celky – sympatikus a parasympatikus. Pôsobia na organizmus ako jeden celok a vzájomne sa dopĺňajú. Vo väčšine orgánov majú protichodné účinky. V niektorých orgánoch sa uplatňuje iba jeden z nich alebo môžu pôsobiť spoločne. Obecne inervácia orgánov nie je rovnomerná. Sympatikus je aktivovaný pri záťaži, kde je žiadaná okamžitá reakcia (útok/útek, zvyšuje krvný tlak, tep srdca, rozširuje priedušky). Parasympatikus sa uplatňuje pri dejoch prebiehajúcich v telesnom pokoji, pripravuje organizmus na získavanie energie a trávenie, tlmí sympatikus.

Hlavným neurotransmitterom na preganglionálnej úrovni je v sympatiku aj parasympatiku acetylcholín. Oba systémy sa odlišujú na postganglionálnej úrovni, kde v parasympatiku zostáva naďalej acetylcholín, ale v sympatiku je nahradený noradrenalínom (len výnimočne sa uplatní acetylcholín). Acetylcholín sa viaže na cholinergné receptory, noradrenalín sa viaže na receptory adrenergné (Petrovický 2008, Švihovec et al. 2018).

Neurotransmitery sa uvoľňujú do synaptickej štrbiny na nervovom zakončení. Vďaka nervovému impulzu dochádza k depolarizácii presynaptickej membrány a k otvoreniu vápenatých kanálov. Zvyšujúca sa koncentrácia Ca^{2+} sprostredkuje uvoľnenie mediátoru exocytózou do štrbiny, kde sa viaže na príslušný postsynaptický receptor (Fontana et al. 2014).

3.3.3.2 Katecholamíny

Medzi katecholamíny zaradujeme adrenalín, noradrenalín a dopamín (DA). Sú to hormóny odvodené od aromatickej aminokyseliny tyrozínu.

V cytoplazme je tyrozín hydroxylovaný pomocou tyrozínhydroxylázy na dihydroxyfenylalanín (DOPA). Ten je v cytoplazme dekarboxylovaný účinkom DOPA-dekarboxylázy na DA. Vďaka dopamín- β -hydroxyláze je v granuliach dopamín hydroxylovaný na NA. Posledným krokom je metylácia aminoskupiny NA v dreni nadobličiek za vzniku adrenalínu. Reakciu katalyzuje N-metyltransferáza.

Pre degradáciu katecholamínov sú dôležité 2 enzýmy. Pôsobením enzýmu katechol-O-metyltransferázy (COMT) dochádza k metylácií hydroxylovej skupiny alebo pôsobením druhého enzýmu monoaminoxidázy (MAO) dochádza k oxidácií aminoskupiny na aldehyd, ktorý je potom oxidovaný na karboxylovú kyselinu. Konečným produktom degradácie je kyselina vanilmandlová, ktorá je z tela vylúčená močom (Fontana *et al.* 2014, Lüllmann *et al.* 2004).

Adrenergný systém

NA a adrenalín na viažu na receptory, ktoré označujeme ako adrenergné. Patria do skupiny metabotropných receptorov spojených s G-proteínom. Rozlišujeme päť podtypov týchto receptorov – α_1 , α_2 , β_1 , β_2 a β_3 (Fontana *et al.* 2014, Švihovec *et al.* 2018).

α_1 -receptory sú umiestnené na postsynaptických efektorových bunkách, hlavne v hladkej svalovine. Sú spojené s Gq-proteínovou dráhou, ktorá aktivuje PLC, čím dochádza k tvorbe IP_3 a DAG, a tým k zvýšeniu intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} . Nastáva vazokonstrikcia najmä kožných, slizničných a splachnických ciev. Zvyšuje sa ich periférna rezistencia a krvný tlak. Okrem toho sa α_1 -receptory podieľajú na mydriáze, znížení vnútroočného tlaku, kontrakcii maternice a zvierača močového mechúra, glykogenolýze, glukoneogenézi a ejakulácii.

α_2 -receptory sa obvykle nachádzajú na presynaptických nervových zakončeníach v trombocytoch, lipocytoch a hladkej svalovine. Sú spojené s Gi-proteínovou dráhou, ktorá inhibuje AC, čím nastáva zníženie intracelulárnej koncentrácie cAMP. Význam α_2 -receptorov spočíva v znížení vyplavovania NA, čo funguje ako negatívny spätnoväzobný regulačný mechanizmus. Ďalej stimulujú agregáciu trombocytov, znižujú tonus sympatiku a tlak krvi a inhibujú uvoľnenie inzulínu.

β_1 -receptory sú lokalizované na postsynaptických efektorových bunkách hlavne kardiomyocytov, lipocytov a neurónov. Presynapticky sú uložené

v juxtaglomerulárnom aparáte, nervových zakončeníach a v epitele riasnatého telesa. Majú pozitívny chronotropný, inotropný, batmotropný a dromotropný účinok na srdce. V obličkách zvyšujú sekréciu renínu aktiváciou RAAS.

β_2 -receptory sa nachádzajú na postsynaptických efektorových bunkách v hladkej svalovine a kardiomyocytoch. Podieľajú sa na vazodilatácií predovšetkým kostrového svalstva a poklese krvného tlaku. Spôsobujú tiež bronchodilatáciu, relaxáciu maternice a močového mechúra, glykogenolýzu a glukoneogéziu.

β_3 -receptory sú umiestnené postsynapticky na efektorových bunkách lipocytov a kardiomyocytov. Zabezpečujú lipolýzu a majú vplyv na termogéziu.

Všetky typy β -receptorov sú spojené s Gs-proteínovou dráhou, ktorá aktivuje AC. Dochádza k zvýšeniu hladiny cAMP a následne intracelulárnej koncentrácie Ca^{2+} . Táto aktivácia podmieňuje ich biologický efekt (Švihovec *et al.* 2018, Fontana *et al.* 2014).

Adrenalín po podaní stimuluje α_1 a β_1 receptory, pričom s odstupom času dochádza k stimulácií aj β_2 receptorov. Výsledkom je zvýšenie srdcovej frekvencie za súčasného zvýšenia tlaku krvi a následne jeho pokles spôsobený vazodilatáciou prostredníctvom β_2 receptorov.

Noradrenalín pôsobí hlavne na α_1 a β_1 receptory, vďaka čomu dochádza k vazokonstrikcii a zvýšeniu srdcovej frekvencie. K vazodilatácií nedochádza, pretože nestimuluje β_2 receptory (Švihovec *et al.* 2018).

Dopaminergný systém

Dopamín je prekursor adrenalínu a noradrenalínu. V nervovej sústave má významnú úlohu pri riadení motorických funkcií a iniciácií rozličných vzorcov chovania.

Viaže sa na päť základných typov dopamínových receptorov – D_1 až D_5 . Všetky sú spojené s G-proteínom ovplyvňujúci aktivitu AC. Podľa toho, či AC stimuluje alebo inhibuje sa delia do dvoch skupín. Prostredníctvom Gs ju D_1 a D_5 aktivujú a pomocou G_i ju D_2 , D_3 a D_4 inhibujú.

V malých dávkach dokáže dopamín rozširovať mezenterické a renálne riečisko, čím zvyšuje renálnu perfúziu a diurézu. Vyvoláva vazodilatáciu stimuláciou D_1 receptorov. S rastúcou koncentráciou dokáže pôsobiť aj na adrenergné β_1 -receptory. Zvyšuje srdcový výdaj a tlak krvi, pričom nedochádza k zmene periférnej cievnej rezistencie. Vo vysokých dávkach prevažuje aktivácia α -receptorov. Výsledkom je pokles renálnej perfúzie, vazokonstrikcia a zvýšenie krvného tlaku.

Poškodenie dopamínových dráh sa spája so vznikom Parkinsonovej choroby. Naopak ich hyperfunkcia sa podieľa na vzniku schizofrénie a bipolárnej afektívnej choroby (Švihovec *et al.* 2018, Fontana *et al.* 2014).

3.3.3.3 Acetylcholín

Acetylcholín je neurotransmitter odvodený od amínu. Pôsobí v centrálnej aj periférnej nervovej sústave. V periférii je mediátorom parasympatického VNS a prenáša signál na nervosvalových platničkách. V CNS moduluje kortikálne aktivity, hlavne bdenie, spánok a vznik pamäte.

Syntéza acetylcholínu prebieha v cholinergných neurónoch naviazaním acetylu z acetylkoenzýmu A na cholín. Reakciu katalyzuje enzým cholínacetyltransferáza. Vzniknutý acetylcholín je potom skladovaný vo vezikulách. Po vzniku akčného potenciálu dochádza k jeho uvoľneniu do synaptickej štrbiny, kde sa môže viazať na dva typy postsynaptických receptorov – muskarínové a nikotínové.

Muskarínové receptory patria medzi metabotropné receptory spojené s G-proteínom. Rozlišujeme 5 typov muskarínových receptorov – M_1 až M_5 . M_1 receptory (neuronálne) nachádzame v CNS. Pôsobia excitačne prostredníctvom Gq-proteínovej dráhy, priaznivo ovplyvňujú kognitívne funkcie a žalúdočnú sekréciu. M_2 receptory (srdcové) sa najviac vyskytujú na kardiomyocytoch. Pomocou Gi-proteínu pôsobia inhibične – negatívne chronotropne na sinoatriálny uzol a negatívne dromotropne na atrioventrikulárny uzol. M_3 receptory (glandulárne) sprostredkujú cholinergnú stimuláciu sekrécie žliaz, kontrakciu hladkého svalstva GIT, vazodilatáciu (vzniká NO) či bronchokonstrikciu spojením s Gq-proteínom. M_4 receptory modulujú aktivitu niektorých iónových kanálov a M_5 modulujú dopamínerný prenos v striate.

Nikotínové receptory sú ionotropné receptory riadené ligandom. Ide o kationové kanály priepustné pre Na^+ a K^+ , v niektorých podtypoch aj pre Ca^{2+} . Rozlišujeme dva typy nikotínových receptorov. Muskulárny typ (N_M) je prítomný hlavne na nervosvalovej platničke, kde zabezpečuje prenos vzruchu a neuronálny typ (N_N), ktorý je prítomný postganglionálne.

Ukončenie cholinergného prenosu zaisťuje enzým acetylcholinesteráza viazaná na postsynaptickej membráne. Produktmi reakcie sú acetát a cholín, ktorý môže byť znovu využitý pri ďalšej syntéze (Švihovec *et al.* 2018, Fontana *et al.* 2014).

3.3.3.4 Serotonín

Serotonín je monoamín odvodенý od aminokyseliny tryptofánu. Nachádzame ho hlavne v trombocytoch, v bunkách gastrointestinálneho traktu a v menšej miere je zastúpený aj v CNS. Význam má ako prenášač nervových vzruchov. V CNS sa podieľa na vzniku nálad, súvisí s cyklom spánku a bdenia či s príjmom potravy – ovplyvňuje receptory chuti a pocit nevoľnosti. Okrem toho má silný vplyv na tonus svalov, podporuje kontrakciu hladkého svalstva a krvnú zrážanlivosť. Je prekursorom melatonínu.

V mozgu sa vyskytuje celkom sedem typov serotonínerných receptorov – 5HT₁ až 5HT₇. 6 z nich sa spája s G-proteínom, výnimkou je 5HT₃ receptor spojený s iónovým kanálom. Efekt serotonínu je závislý na type receptorov.

K vazokonstrikcii hladkého svalstva dochádza priamo stimuláciou 5-HT₂ receptorov (G_q) vo veľkých cievach a 5-HT₁ (G_i) v mozgových cievach. V určitých cievach môžu byť kontrakčné účinky zosilnené hypoxiou alebo miernym ochladením. Naopak vazodilatáciu môže spôsobiť aktiváciou endotelálnych 5-HT₂ receptorov alebo 5-HT₇ receptorov (G_s) (Fontana *et al.* 2014, Švihovec *et al.* 2018, Van Nueten 1985).

3.3.3.5 Vazopresín

Vazopresín alebo antidiuretický hormón je cyklický nonapeptid syntetizovaný v hypotalame a v menšej miere produkovaný gonádami a v kôre nadobličiek. Fyziologickou funkciou vazopresínu je resorpcia vody v obličkách, čo umožňuje zvýšenie príjmu tekutín a zvýšenie tlaku krvi.

Vazopresín sa viaže na tri receptory spojené s G-proteínom – V1a, V1b a V2. V1a je vaskulárny receptor nachádzajúci sa hlavne v bunkách hladkého svalstva ciev. Aktivovaný receptor V1a riadi krvný tlak, glykogenolýzu a uľahčuje vazokonstrikciu prostredníctvom aktivácie PLA a PLC, čo mobilizuje intracelulárne ióny vápnika. Receptory V1b sa vyskytujú v prednej hypofýze a periférnych tkanivách. Riadia exkréciu adrenokortikotropného hormónu a regulujú kardiovaskulárne funkcie pomocou sekrécie katecholamínov. Podieľajú sa tiež na modulácií správania a na pamäťovom procese. Spolu s V1a receptormi sú spojené s G_q-proteínovou dráhou (kaskáda IP₃ a DAG).

Receptory V2 sa nachádzajú v obličkách na bazolatelárnom povrchu renálnych tubulárnych buniek. Ich hlavnou úlohou je resorpcia vody z moču (a teda zníženie jeho objemu). Mechanizmus resorpcie je založený na zmenách osmolality plazmy. Proces zvýšenia alebo zníženia osmolality plazmy je veľmi citlivý, aj zmena o 1%

môže ovplyvniť sekréciu a inhibíciu vazopresínu. Po naviazaní vazopresínu na V2 receptor dochádza k aktivácií AC a k produkcií cAMP. Ten ďalej aktivuje PKA, ktorá fosforyluje koncové zvyšky akvaporínov. Voda sa cez tieto kanály dokáže reabsorbovať do interstícia a následne do krvi. Vazopresín týmto spôsobom tiež ovplyvňuje cievny systém.

Pri nedostatočnej produkcii vazopresínu alebo pri neschopnosti orgánov naň reagovať vzniká syndróm nazývaný diabetes insipidus. Prejavuje sa nadmerným vylučovaním hypotonického moču. Vykompenzovať sa dokáže nadmerným príjmom tekutín (Glavaš *et al.* 2022, Zeynalov *et al.* 2019)

3.3.3.6 Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy sú hormóny odvodené od srdca, ktoré majú pleiotropné kardiometabolické ochranné účinky. Existujú tri hlavné natriuretické peptidy – atriálny natriuretický peptid (ANP), mozgový natriuretický peptid (BNP) a natriuretický peptid typu C (CNP).

ANP je syntetizovaný v predsieňach srdca vo forme prehormónu tvorený 126 aminokyselinami. BNP je vylučovaný v komorách srdca tiež vo forme prehormónu tvoreného zo 108 aminokyselín. Prvýkrát bol popísaný v prasacom mozgu. ANP aj BNP sa uvoľňujú ako odpoveď na natiahnutie predsiení a komôr a spôsobujú vazodilatáciu, inhibíciu sekrécie aldosterónu v kôre nadobličiek či inhibíciu produkcie renínu v obličkách. Vyvolávajú natriurézu a zníženie intravaskulárneho objemu. CNP je secernovaný endotelom ciev. Má vazodilatačný účinok, ale nemá významné diuretické alebo natriuretické účinky.

Natriuretické peptidy sa viažu na receptory plazmatickej guanylylcyklázy A (pre ANP a BNP) a B (pre CNP). Sú to transmembránové proteíny katalyzujúce premenu GTP na cGMP, čo potom zvyšuje intracelulárnu PKG. Receptor pre CNP funguje prevažne ako clearancový receptor pre všetky tri natriuretické peptidy, ale pôsobí tiež na inhibičné G-proteíny a adenyllylcyklázu s aktiváciou PLA. Receptory pre natriuretické peptidy sa nenachádzajú len na kardiomyocytoch a fibroblastoch, ale aj v obličkách, cievnom a gastrointestinálnom hladkom svalstve, mozgu, pankrease a pečeni, čo naznačuje ich účinky nad rámec natriurézy.

Medzi natriuretické peptidy patrí tiež urodilatín pochádzajúci z rovnakého prekursoru ako ANP. Syntetizuje sa v tubulárnych bunkách obličiek. Jeho fyziologická funkcia je regulácia homeostázy Na⁺ a vody. Všetky zásahy do vodného hospodárenia ovplyvnia aj cievny systém.

Okrem inaktivácie cez receptor pre CNP sú natriuretické peptidy eliminované neutrálnymi endopeptidázami v renálnych tubulárnych bunkách a môžu byť tiež pasívne vylučované močom (Gupta *et al.* 2015, Cho *et al.* 1999, Forssmann *et al.* 2001).

3.4 Polyfenoly

Polyfenoly sú skupinou fytochemikálií s potenciálnymi zdraviu prospešnými účinkami najmä pri pravidelnom príjme. V tele majú mnoho rôznych účinkov, napr. pôsobia ako antioxidanty proti voľným radikálom, ktoré by inak poškodili bunky a zvýšili riziko ochorení ako je rakovina, cukrovka alebo KVO.

Polyfenoly majú štruktúru fenylypropanoidov a prispievajú nielen k chuti, farbe, vôni, horkosti a oxidačnej stabilite, ale zohrávajú aj dôležitú úlohu pri chemickej obrane rastlín. Sú syntetizované rastlinami ako sekundárne metabolity v nepriaznivých situáciách, napr. v prítomnosti patogénov alebo v nepriaznivých klimatických podmienkach. Dnes je identifikovaných viac než 8000 fenolových molekúl obsahujúcich aspoň jedno aromatické jadro a jednu alebo viac hydroxylových skupín. Väčšina polyfenolov sa v rastlinách vyskytuje ako glykozylované deriváty. Aby boli v ľudskom tele bioaktívne, prechádzajú črevnými premenami pôsobením nielen tráviacich enzýmov ale aj vplyvom metabolizmu mikrobiómu. Odhadovaný príjem polyfenolov pre bežnú populáciu zahŕňajúcu mladých ľudí, dospelých a starších ľudí je 0,9 g denne. Hlavnými zdrojmi sú káva, čaj, červené víno, ovocie a zelenina.

Polyfenoly delíme na flavonoidy vyznačujúce sa štruktúrou $C_6-C_3-C_6$ a neflavonoidy (fenolové kyseliny, kyseliny hydroxyškoricové, lignany, stilbény a taníny) (Di Lorenzo *et al.* 2021, Marín *et al.* 2015, Singh *et al.* 2021).

3.4.1 Flavonoidy

Flavonoidy predstavujú deriváty 2-fenylchromanu. Podľa stupňa oxidácie ich pyranového kruhu ich rozdeľujeme na flavony, flavonoly, dihydroflavonoly, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly, chalkóny a auróny. Patria medzi polyfenoly s nízkou molekulovou hmotnosťou rozsiahlo rozšírené v rastlinnej ríši. Tvoria jednu z najcharakteristickejších tried zlúčenín vo vyšších rastlinách.

Mnoho flavonoidov sa dá jednoducho rozpoznať ako pigmenty kvetov krytosemenných rastlín, vďaka čomu kvety priťahujú opelovačov. Pigmenty sú rozpustné vo vode a uložené vo vakuolách rastlinných buniek.

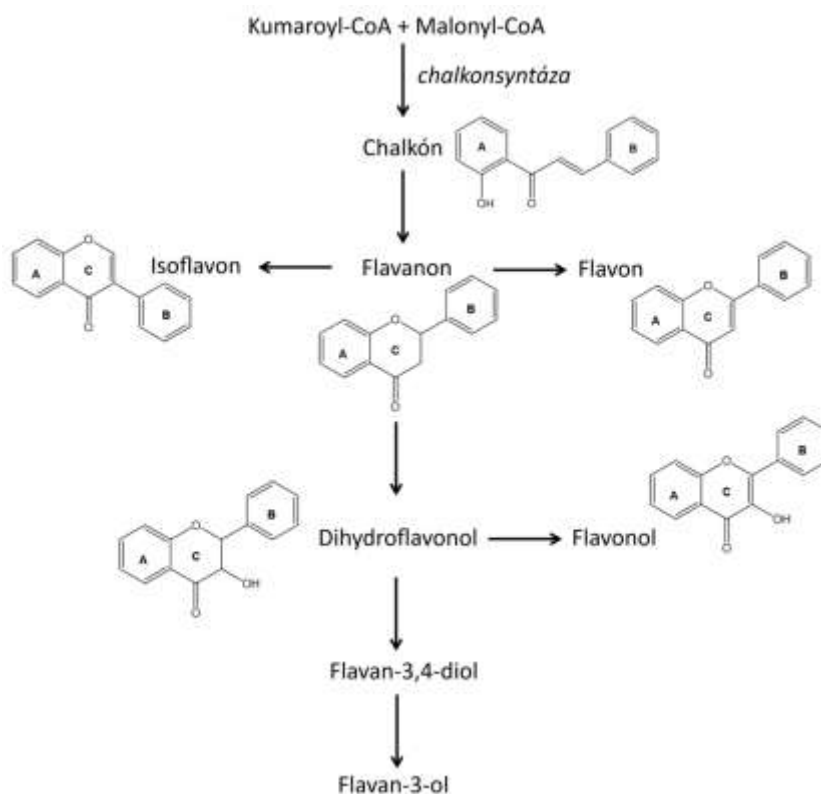
Flavonoidy, ktoré sa nachádzajú v potravinách a nápojoch, nazývame dietetické flavonoidy (Spilková *et. al.* 2016, Panche *et al.* 2016, Liu *et al.* 2021).

3.4.1.1 Biosyntéza flavonoidov

Flavonoidy vznikajú ako produkty vznikajúce dvomi hlavnými cestami – šikimátovou a acetátovou, pričom východnou zlúčeninou oboch dráh je glukóza.

V acetátovej dráhe sa kyselina octová premieňa na svoju aktívnu formu acetyl-CoA, neskôr sa mení na malonyl-CoA, ktorý sa buď primárnou cestou metabolizuje na mastné kyseliny alebo sa sekundárnou cestou z neho syntetizuje kruh A flavonoidov. Prostredníctvom šikimátovej cesty vzniká aromatická aminokyselina fenylalanín. Deamináciou fenylalanínu vzniká kyselina škoricová, ktorá hydrolyzuje na kyselinu kumarovú. Z nej sa potom pridaním koenzýmu A formuje kumaroyl-CoA. Šikimátovou cestou tak vznikajú kruhy B a C flavonoidov.

Aktivované formy týchto kyselín s koenzýmom A kondenzujú a vytvárajú šesťuhlíkaté produkty odvodené od malonátu. Cyklizáciou vzniká základná kostra flavonoidov – chalkón (C₁₅), z ktorého sa následne vytvárajú ďalšie flavonoidy. Deriváty sa formujú zavedením alebo odstránením hydroxylových skupín (Spilková *et. al.* 2016, Liu *et al.* 2021). (Obr. 6)



Obr. 6 Biosyntéza flavonoidov

Prevzaté a upravené z: Dias *et al.* 2021

3.4.1.2 Metabolizmus flavonoidov

Biologická dostupnosť flavonoidov závisí od mnohých parametrov ako je zdroj, z ktorého pochádzajú, trávenie, stupeň funkčnosti črevnej mikroflóry, absorpcia a metabolizmus.

Flavonoidy sa všeobecne konzumujú ako glykozidy. Na rozdiel od makroživín a mikroživín sa veľká časť flavonoidov neabsorbuje v tenkom čreve, ale dostáva sa do hrubého čreva, kde je vystavená fermentácii mikrobiómom. V čreve pomocou hydrolázy dochádza k hydrolýze glykozidu na jeho príslušné aglykóny. Tie potom môžu vstupovať do epiteliálnych buniek pasívnou difúziou vďaka ich zvýšenej lipofilite. Alternatívou je transport glykozidov pomocou epitelových transportérov (napr. sodík dependentný transportér glukózy). Dochádza k efluxu bioaktívnych zlúčenín cez bazolaterálnu membránu do portálneho krvného obehu, čím sa uľahčuje absorpcia.

V pečeni prechádzajú flavonoidy I. fázou metabolizmu – oxidáciou alebo O-demetyláciou, ktorá pokračuje do II. fázy metabolizmu – glukuronidácie, sulfatácie alebo metylácie. Vznikajú viac polárne zlúčeniny distribuované do krvi s celým radom biologických účinkov na cieľové orgány.

Metabolity sa môžu vylučovať močom alebo žlčou. Flavonoidy, ktoré sú vylúčené žlčou do dvanástnika, sú vystavené ďalšiemu pôsobeniu mikrobiálnych enzýmov. Môžu byť znova reabsorbované a podliehať enterohepatálnej recyklácii.

Metabolizmus hrubého čreva patrí medzi hlavných prispievateľov celkového metabolizmu flavonoidov. Nie je však úplne jasné, ako dobre sa metabolity absorbujú. Existuje široká interindividuálna variabilita v biokonverzii špecifických flavonoidov, ktorá sa sčasti pripisuje rôznym enterotypom jednotlivcov. Môže súvisieť s tým, že aj malé rozdiely v chemickom zložení flavonoidov môžu viesť k veľkým zmenám v hrubom čreve v modulácií interakcie flavonoid-mikrobióm spolu so zvyčajnou stravou, ktorá sa významne líši medzi obyvateľstvom (Cassidy a Minihane 2017, Ciumărnean *et al.* 2020, Kumar *et al.* 2019) (Obr. 7)

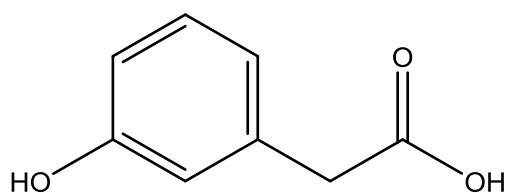
flavonoidy tiež inhibujú aktivitu ACE, a tým zlepšujú systolický a diastolický krvný tlak (Hügel *et al.* 2016, Ciumărnean *et al.* 2020, Panche *et al.* 2016).

Vďaka poklesu tlaku krvi, oxidácii lipidov a zlepšeniu funkcie endotelu pôsobením flavonoidov dochádza k zníženiu výskytu ischemických príhod (Ciumărnean *et al.* 2020).

Podporu funkcie ciev flavonoidmi podporujú štúdie na zvieracích modeloch aj na ľuďoch. Aktivita flavonoidov môže mať klinický význam, avšak sú potrebné ďalšie overenia. Je dôležité identifikovať jednotlivé skupiny ľudí, ktorých cievy budú profitovať zo zvýšeného príjmu flavonoidov. Množstvo, typ a forma ich príjmu si taktiež vyžadujú ďalšie štúdie (Gross 2009).

3.4.2 Kyselina 3-hydroxyfenyloctová

Kyselina 3-hydroxyfenyloctová je malá fenolová kyselina (Obr. 8) tvorená črevnou mikroflórou ako metabolit flavonoidu kvercetínu. 3-HPAA bola detegovaná ako kľúčový katabolit v ľudskom moči po konzumácii čokolády. V súlade s tým bola potom identifikovaná ako jeden z hlavných produktov štiepenia kruhu kvercetínových glykozidov (Zabela *et al.* 2020, Liu *et al.* 2022).

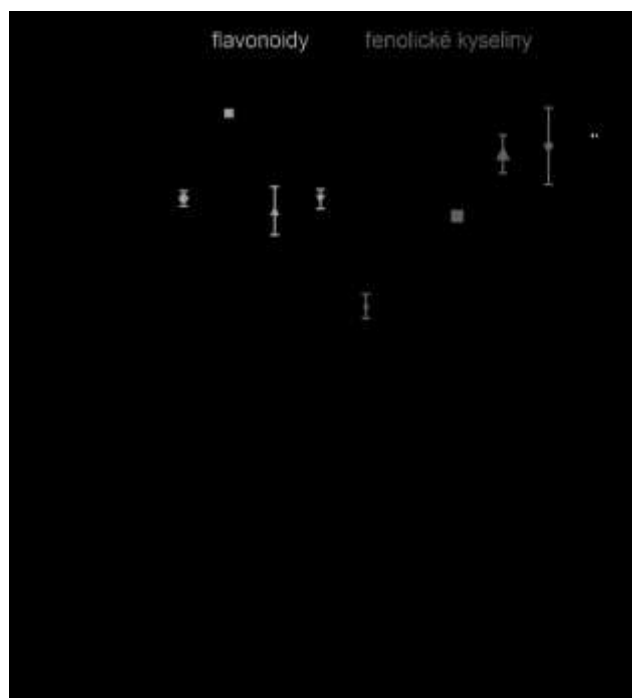


Obr. 8 Štruktúra kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej

Účinkami 3-HPAA sa zaoberá mnoho výskumov. Zhou *et al.* identifikovali 3-HPAA z výkalov cvičených myší po infarkte myokardu, ktorá chráni pred srdcovou dysfunkciou po infarkte myokardu a apoptózou prostredníctvom NRF2. Výsledky Liu *et al.* naznačujú, že 3-HPAA zmierňuje acetaldehydom indukovanú cytotoxicitu na modeloch hepatocytov pravdepodobne prostredníctvom regulácie celkovej aktivity aldehyddehydrogenázy. Dokáže tak ochrániť pred poškodením pečene spôsobeným alkoholom. Štúdia od Ono *et al.* ukazuje na schopnosť 3-HPAA inhibovať agregáciu a ukladanie α -sukleínu, čo sú hlavné patologické rysy Parkinsonovej choroby alebo demencie s Lewyho telieskami.

Najmanová *et al.* svojou štúdiou zistili, že niektoré metabolity kvercetínu tvorené ľudskou mikroflórou majú vazodilatačné účinky *in vitro* na hladkom svale aortálnej cievy (Obr. 9). Potvrdili, že 3-HPAA ako druhá najúčinnějšía zlúčenina mala priamy

vplyv na zníženie arteriálneho tlaku *in vivo* u zdravých aj spontánne hypertenzných potkanov.



Obr. 9 Vazodilatačná aktivita testovaných metabolitov kvercetínu (EC_{50})
Prevzaté a upravené z: Najmanová *et al.* (2016)

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce bolo potvrdiť vazodilatačný účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej na koronárnych cievach a objasniť možný mechanizmus tohto pôsobenia.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Zvieratá

Experimenty sa uskutočnili na segmentoch prasacích koronárnych artérií. Jedenásť prasacích srdc bolo získaných z bitúnku Bocus a.s. (Letohrad). Patrili zdravým ošípaným oboch pohlaví zo štandardného chovu pod veterinárnou kontrolou určené na konzumáciu. Srdcia boli spracované na experimenty približne 4 hodiny po zabití zvieratá.

5.2 Použité vybavenie

5.2.1 Prístroje a pomôcky

Na vykonanie experimentov bolo použité:

- Aparatúra pre izolované tkanivo *ex vivo* (Multi chambre tissue bath system), (Experimentia Ltb., Budapešť, Maďarsko)
- Force/Displacement transducer (Experimentia Ltb., Budapešť, Maďarsko)
- Plynová fľaša s preumoxidom (zmes 95% O₂/5% CO₂) (Linde gas, Česko)
- Termostat U1 (Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Drážďany, Nemecko)
- Vyhodnocovací software, S.P.E.L., Advanced Kymograph Software SOFT-03-KYMO (Experimentia Ltb., Budapešť, Maďarsko)
- Software GraphPad Prism 9
- Počítač, program Excel
- Laboratórne váhy (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemecko)
- Analytické váhy Explorer Analytical
- Trepačka IKA Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemecko)
- Injekčné striekačky, ihly
- Laboratórne sklo (kadičky, lyžičky, mikropipety, odmerné valce, tyčinky, skúmavky, Petriho misky)
- Operačný stolík, operačné nástroje (nožnice, peán, pinzety)
- Iné laboratórne pomôcky – vata, gáza, gumové rukavice, mikroskúmavky (Eppendorf) a špičky

5.2.2 Chemikálie

Na vykonanie experimentov bol použitý Krebsov roztok, rozpúšťadlá, látky ovplyvňujúce hladký cievny sval a kyselina 3-hydroxyfenyloctová.

Krebsov živný roztok

Izotonický Krebsov roztok o pH 7,4 bol pri experimentoch využívaný ako živné médium. Svojimi vlastnosťami vytvára podmienky veľmi podobné vnútornému prostrediu organizmu. Pripravoval sa navážením látok z Tab. 1 mimo chloridu vápenatého. Látky sa rozpustili v menšom množstve destilovanej vody. Chlorid vápenatý sa zväžil a rozpustil zvlášť, čím sme predchádzali vzniku slabo rozpustných vápenatých solí. Oba roztoky sa nakoniec zmiešali a doplnili destilovanou vodou na požadovaný objem.

Tab. 1 Zloženie Krebsovho roztoku

| Názov látky | Vzorec | MW (g/mol) | Koncen- trácia (g/l) | Výrobca |
|--|---|---------------|-------------------------|---|
| Chlorid sodný p.a. | NaCl | 58,44 | 5,54 | PENTA s.r.o., Česko |
| Chlorid draselný p.a. | KCl | 74,55 | 0,35 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| Chlorid vápenatý p.a. | CaCl ₂ | 110,99 | 0,28 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| Hydrogénuhličitan sodný p.a. | NaHCO ₃ | 84,01 | 2,1 | PENTA s.r.o., Česko |
| Dihydrogénfosforečnan draselný p.a. | KH ₂ PO ₄ | 136,09 | 0,16 | RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česko |
| Síran horečnatý heptahydrát p.a. | MgSO ₄ .7H ₂ O | 246,47 | 0,29 | Lachema Brno, Česko |
| D-glukóza monohydrát p.a. | C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O | 180,16 | 2,1 | PENTA s.r.o., Česko |

Použité rozpúšťadlá uvádza Tab. 2.

Tab. 2 Rozpúšťadlá

| Názov látky | Vzorec | MW | Výrobca |
|-------------------------|------------------------------------|-------|-------------------------------------|
| Dimethylsulfoxid | (CH ₃) ₂ SO | 78,13 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| Destilovaná voda | H ₂ O | 18,02 | FaF UK HK, podľa platného liekopisu |
| MiliQ voda | H ₂ O | 18,02 | FaF UK HK, podľa platného liekopisu |

Tab. 3 Vazoaktívne látky

| Názov látky | Vzorec | MW | Výrobca |
|--|---|---------|--|
| 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, Nemecko |
| Nifedipín | $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$ | 346,335 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| Bradykinín | $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{N}_{15}\text{O}_{11}$ | 1060,2 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| Bay K8644 | $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_4$ | 356,3 | Axon Medchem BV, Groningen, Holandsko |
| Chlorid draselný | KCl | 74,55 | Lachema Brno, Česko |

Použitých antagonistov uvádza Tab. 4.

Tab. 4 Antagonisti

| Názov | Cieľ | MW | Výrobca |
|--------------------|-------------------------|--------|------------------------|
| L-NAME | eNOS | 233,23 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| Atropín | Muskarínové receptory | 289,4 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| TRAM-34 | IK_{Ca} | 344,8 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| Indometacín | COX | 357,8 | Sigma-Aldrich, Nemecko |
| UCL-1684 | SK_{Ca} | 494,6 | Sigma-Aldrich, Nemecko |

IK_{Ca} – vápnikom aktivované draslíkové kanály so strednou vodivosťou,

SK_{Ca} – vápnikom aktivované draslíkové kanály s malou vodivosťou

Tab. 5 Pripravené základné roztoky

| Názov látky | Rozpúšťadlo | Koncentrácia ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) | Následné riedenie | Koncentrácia v nádobkách ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) |
|--------------------|-------------|---|----------------------|--|
| TRAM-34 | 20% DMSO | 10 | Krebsov roztok | 10 |
| UCL-1684 | 10% DMSO | 10^3 | Krebsov roztok | 1 |
| Indometacín | 20% DMSO | 10 | Krebsov roztok | 10 |
| Bay K8644 | DMSO | 10 | miliQ | 10^{-4} -10 |

Ako negatívne kontroly sa používali krúžky inkubované s odpovedajúcim objemom vehikula.

Tab. 6 Testovaný metabolit polyfenolov

| Názov | Skratka | MW | Výrobca |
|--------------------------------------|---------|--------|------------------------------------|
| 3-hydroxyfenyloctová kyselina | 3-HPAA | 152,15 | Toronto Research Chemicals, Kanada |

5.3 Metodika

5.3.1 Pribeh experimentu

Príprava tkaniva

Po prijatí srdc z bitúnku boli všetky ponorené do Krebsovho roztoku. Ľavá koronárna artéria bola vzápätí opatrne vyrezaná a znova ponorená do Krebsovho roztoku. Očistila sa od tuku, spojivového tkaniva a krvi. Takto očistená koronárna artéria bola narezaná na cylindrické krúžky s dĺžkou približne 3 mm. Na určité experimenty bola vrstva endotelu mechanicky narušená jemným trením luminálneho povrchu pinzetou. Krúžky sa potom udržiavali v naplnených tkaninových kúpeľoch Krebsovým roztokom v okysličených podmienkach (95% O₂/5% CO₂) pri 37 °C. Každý arteriálny krúžok bol zavesený medzi dvomi drôtenými háčikmi z nehrdzavejúcej ocele, pričom jeden z nich bol pripevnený k držiaku a druhý bol pripojený k prevodníku a počítaču vybavenému vyhodnocovacím softvérom S.P.E.L. Advanced Kymograph Software. Toto usporiadanie umožňovalo merania izometrického napätia.

Stabilizácia a záťaž tkaniva

Pred samotným pokusom sme najskôr tkanivo stabilizovali. Pomocou otočných regulačných skrutiek sme postupne pridávali aortálnym krúžkom záťaž, aby nedošlo k ich poškodeniu – približne 0,15 až 0,2 g každých 30 sekúnd. Keď bola dosiahnutá hodnota 2 g, nechali sme krúžky stabilizovať 45 minút, počas ktorých sme každých 10 minút obmieňali Krebsov roztok v meracích nádobkách.

Test kontraktility tkaniva

Po stabilizácii tkaniva sa napätie nastavilo na 1 g, tzv. základnú líniu (baseline). Každá nádobka sa naplnila 5 ml Krebsovho roztoku a vykonal sa test kontraktility. Koronárne krúžky boli kontrahované KCl s konečnou koncentráciou vo vnútri nádoby 40 mmol.l⁻¹. Keď došlo ku kontrakcii a následne bolo dosiahnuté plató, pridal sa do nádobiek bradykinín s koncentráciou 300 nmol.l⁻¹. Vazodilatácia potvrdila prítomnosť celistvého endotelu alebo obnaženého krúžku. Potom sa nádoby s krúžkami ešte niekoľkokrát premyli Krebsovým roztokom tak, aby v nich nebol

prítomný zvyšný KCl alebo bradykinín. Krúžky sa opäť nechali stabilizovať na základnú líniu a nádoby boli naplnené presne 5 ml Krebsovho roztoku.

Overenie vazodilatačného účinku 3-HPAA

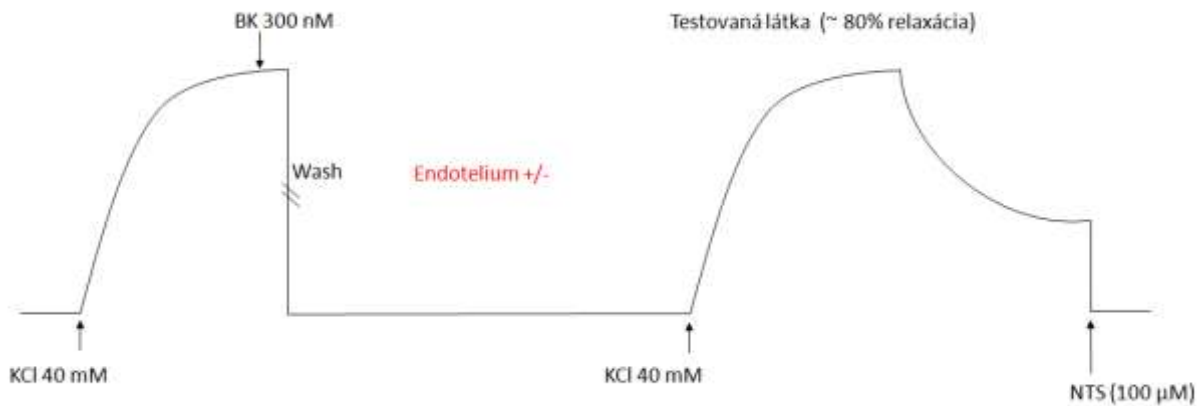
Na overenie vazodilatačného účinku 3-HPAA museli byť krúžky vopred kontrahované KCl s koncentráciou 40 mmol.l^{-1} . Po ustálení odpovede sa do nádobiek kumulatívne pridávala 3-HPAA v koncentráciách v rozmedzí od $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ do 1 mmol.l^{-1} k navodeniu vazodilatácie. 3-HPAA bola pripravená v Krebsovom roztoku. Do niektorých nádobiek sa pridával Krebsov roztok bez testovanej zlúčeniny s odpovedajúcim objemom a s použitím rovnakého postupu ako kontrola. Každá dávka sa aplikovala po stabilizácii relaxačnej odpovede spôsobenej predchádzajúcou dávkou. Po stabilizácii odpovede na poslednú dávku 3-HPAA bol nakoniec pridaný nitroprusid sodný s koncentráciou $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ na vyvolanie maximálnej, teda 100% relaxácie vo všetkých nádobkách.

Vlastný experiment

Vlastný experiment spočíval v testovaní možného mechanizmu účinku 3-HPAA. Podľa vyššie popísaného postupu sa všetky tkanivá pripravili, stabilizovali a prešli testom kontraktility. Potom nasledovali jednotlivé pokusy k overeniu mechanizmu účinku.

a) Testovanie závislosti vazodilatačného účinku na prítomnosti endotelu

Pri príprave tkaniva sme z niektorých aortálnych krúžkov pred zavesením na háčiky odstránili endotel. Endotel bol odstránený jemným trením vnútorného povrchu pinzetou. V ostatných krúžkoch zostal endotel nedotknutý. Potom sme s pripravenými krúžkami pokračovali podľa uvedeného postupu. Prvým krokom pokusu bolo navodenie kontrakcie pomocou KCl s finálnou koncentráciou 40 mmol.l^{-1} . Ďalej sme pridávali testovanú zlúčeninu, t.j. 3-HPAA (konečná koncentrácia 1 mmol.l^{-1} , čo odpovedá EC_{80}). Nakoniec sme pridali NTS (v nádobkách $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$), ktorý navodil 100% dilatáciu krúžkov (viz obr. 10).



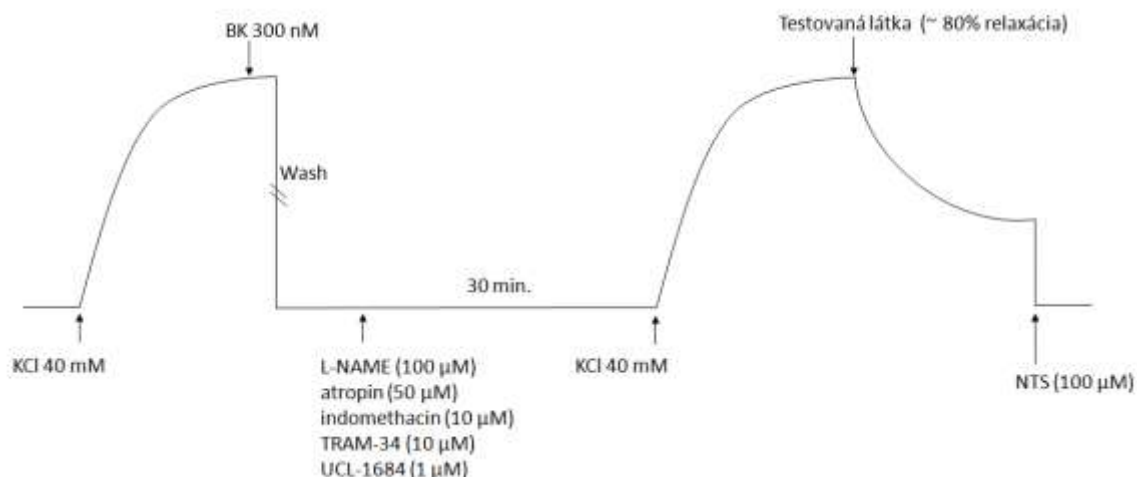
Obr. 10 Schéma pokusu, ktorý overuje, či je účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (testovaná látka) závislý na prítomnosti funkčného endotelu

b) Testovanie, či je 3-HPAA aktivátorom eNOS, muskarínových receptorov, COX, IK_{Ca} a SK_{Ca}

Pri testovaní možných mechanizmov účinku sme používali aortálne krúžky s celistvým endotelom.

Vlastný pokus začal pridaním jednotlivého antagonistu do nádobiek s krúžkami – L-NAME (koncentrácia $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$) alebo atropín (koncentrácia $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$) alebo indometacín (koncentrácia $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) alebo UCL-1684 (koncentrácia $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$) alebo TRAM-34 (koncentrácia $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) s dobou inkubácie 30 minút. Príprava roztokov a použité koncentrácie sú zhrnuté v tabuľke 5. Ako kontrola bolo použité samotné rozpúšťadlo s rovnakým objemom.

Nasledovalo navodenie kontrakcie krúžkov podaním KCl (koncentrácia 40mmol.l^{-1}). Nato sa pridala testovaná zlúčenina 3-HPAA s finálnou koncentráciou 1mmol.l^{-1} vyvolávajúca 80% relaxáciu. Ako posledný bol pridaný NTS (koncentrácia $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$) a nastala maximálna relaxácia tkaniva (viz obr. 11).

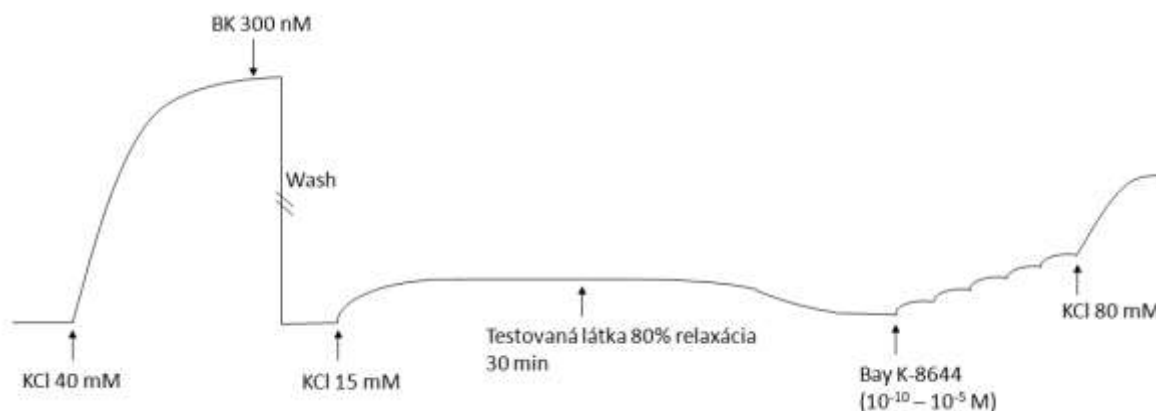


Obr. 11 Schéma pokusu, ktorý overuje, či je kyselina 3-hydroxyfenyloctová (testovaná látka) aktivátorom eNOS, muskarínových receptorov, COX, IK_{Ca} a SK_{Ca}

c) Testovanie, či je 3-HPAA antagonistom vápnikových kanálov L-typu

Pri testovaní tohto mechanizmu účinku sme používali aortálne krúžky s odstráneným endotelom.

Vlastný pokus sme zahájili pridaním KCl (koncentrácia 15 mmol.l^{-1}) a počkali sme, kým sa odpoveď stabilizuje. Draselné kationy podporujú depolarizáciu a zvyrazňujú neskôr navodzovanú vazokonstrikciu. Nasledovala 30 minútová inkubácia tkaniva s 3-HPAA v požadovanej koncentrácii 1 mmol.l^{-1} odpovedajúca EC_{80} na koronárnej cieve. Ako pozitívnu kontrolu sme použili známy blokátor vápnikových kanálov nifedipín s finálnou koncentráciou 150 nmol.l^{-1} a ako negatívnu kontrolu sme použili čistý DMSO. Ďalšia časť experimentu prebiehala v zatemnenej miestnosti, pretože svetlo ovplyvňuje stabilitu Bay K8644. Pripravený Bay K8644 v DMSO a následne ďalej nariadený miliQ na potrebné koncentrácie sme začali postupne kumulatívne pridávať do nádobiek vo vzrastajúcich koncentráciách (100 pmol.l^{-1} – 10 μmol.l^{-1}) na navodenie konstrikcie. V poslednom kroku sme pridali KCl (koncentrácia 80 mmol.l^{-1}), aby sme dosiahli maximálnu konstrikciu (viz obr. 12).



Obr. 12 Schéma pokusu, ktorý overuje, či je kyselina 3-hydroxyfenyloctová (testovaná látka) antagonistom vápnikových kanálov L-typu

5.3.2 Zhodnotenie nameraných dát

K vyhodnoteniu nameraných dát sme používali programy Excel a GraphPad Prism 9.

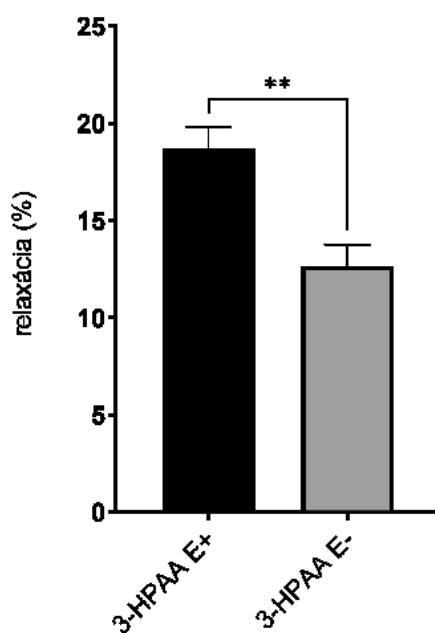
- a) Vyhodnotenie závislosti vazodilatačného účinku na prítomnosti endotelu a aktivácie eNOS, muskarínových receptorov, COX, IK_{Ca} a SK_{Ca}

Dilatáciu navodenú jednou dávkou 3-HPAA ($\sim EC_{80}$) sme vyjadrili ako % z maximálnej možnej dilatácie. Za maximálnu dilatáciu sme považovali tú, ktorú navodil NTS ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) podaný na záver pokusu. Významnosť sme hodnotili pomocou t-testu.

- b) Vyhodnotenie blokády vápnikových kanálov L-typu

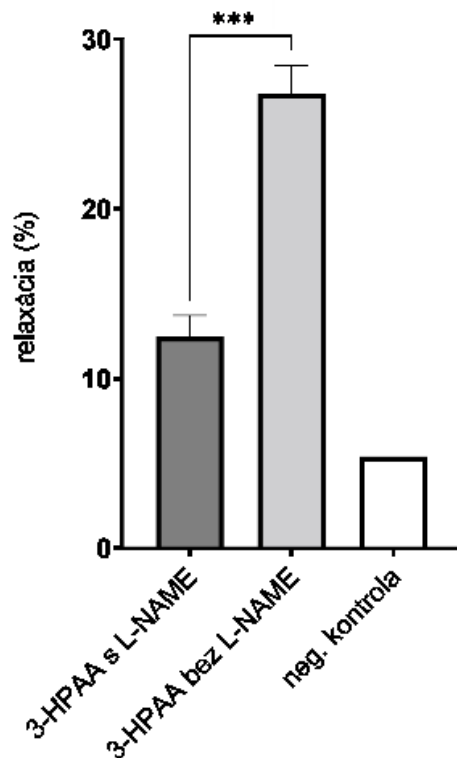
Kontrakciu navodenú kumulatívnym podaním Bay K8644 sme vyjadrili ako % z maximálnej možnej kontrakcie. Za maximálnu kontrakciu sme považovali tú, ktorú navodil KCl (60 mmol.l^{-1}) podaný na záver pokusu. Významnosť sme hodnotili pomocou testu two-way ANOVA s následným Dunnettovým testom.

6 VÝSLEDKY



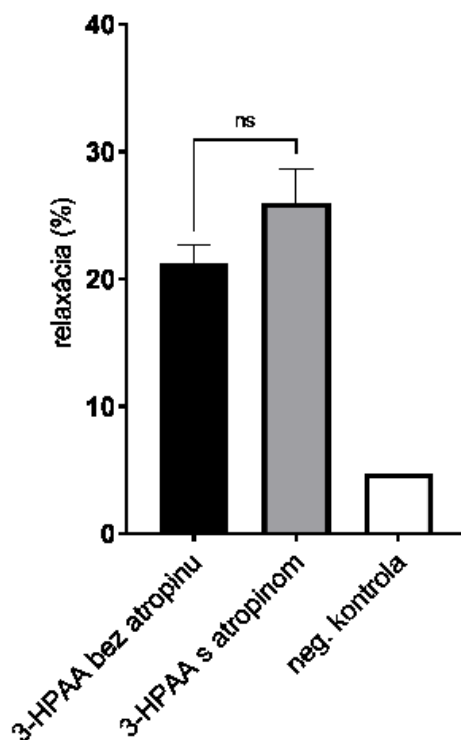
Graf 1. Vplyv prítomnosti endotelu na vazodilatačný účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (3-HPAA).

Graf znázorňuje relaxáciu navodenú podaním 3-HPAA (1 mmol.l^{-1}) u krúžkov izolovanej prasacej koronárnej artérie *ex vivo* prekontrahovaných pomocou KCl (40 mmol.l^{-1}). Relaxácia bola zameraná izometricky a vyjadrená ako percento z maximálnej možnej. Za maximálnu relaxáciu sme považovali tú, ktorá bola navodená na záver nitroprusidom sodným ($100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z najmenej 6 meraní, krúžky v jednej skupine boli získané z rôznych zvierat. E+ cieva má zachovalý funkčný endotel, E- endotel bol odstránený. $**p < 0,01$.



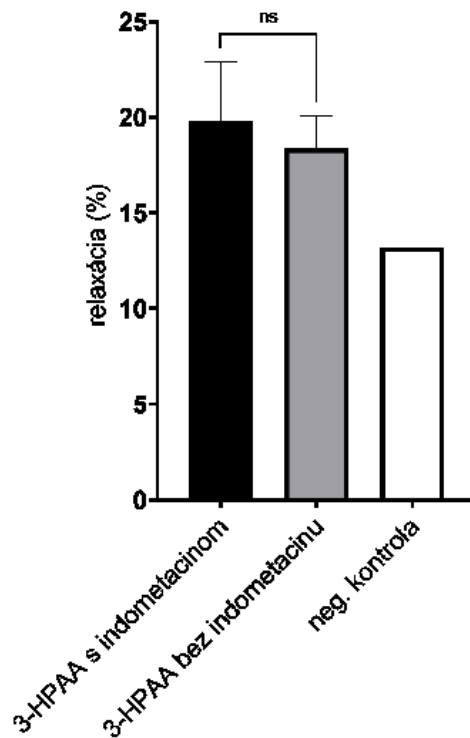
Graf 2. Vplyv aktivity eNOS a vzniku NO na vazodilatačný účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (3-HPAA).

Graf znázorňuje relaxáciu navodenú podaním 3-HPAA (1 mmol.l^{-1}) u krúžkov izolovanej prasacej koronárnej artérie *ex vivo* s celistvým endotelom. Krúžky boli inkubované v prítomnosti eNOS inhibítora L-NAME ($100 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$). Následne boli kontrahované pomocou KCl (40 mmol.l^{-1}) a relaxované 3-HPAA (1 mmol.l^{-1}). Ako kontrola boli použité krúžky s 3-HPAA bez prítomnosti L-NAME a ako negatívna kontrola bolo použité čisté vehikulum (Krebsov roztok). Relaxácia bola zmeraná izometricky a vyjadrená ako percento z maximálne možnej. Za maximálnu relaxáciu sme považovali tú, ktorá bola navodená na záver nitroprusidom sodným ($100 \text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z najmenej 6 meraní, u kontrol 4 merania, krúžky v jednej skupine boli získané z rôznych zvierat. *** $p < 0,001$.



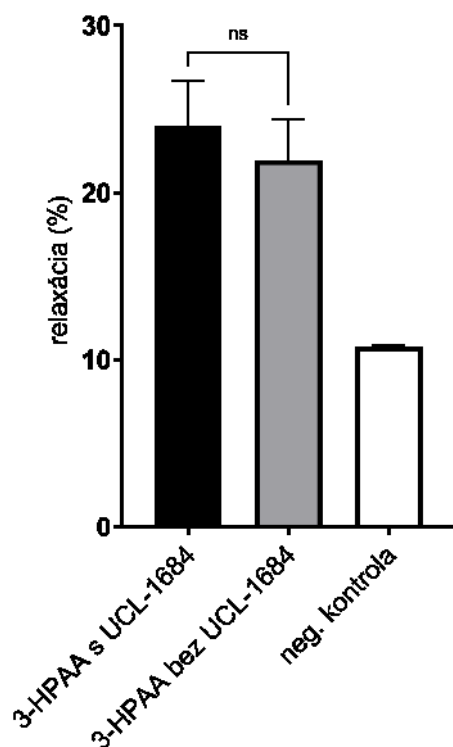
Graf 3. Vplyv aktivity muskarínových receptorov na vazodilatačný účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (3-HPAA).

Graf znázorňuje relaxáciu navodenú podaním 3-HPAA (1 mmol.l^{-1}) u krúžkov izolovanej prasacej koronárnej artérie *ex vivo* s celistvým endotelom. Krúžky boli inkubované v prítomnosti antagonistu muskarínových receptorov atropínu ($50 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Následne boli kontrahované pomocou KCl (40 mmol.l^{-1}) a relaxované 3-HPAA (1 mmol.l^{-1}). Ako kontrola boli použité krúžky s 3-HPAA bez atropínu a ako negatívna kontrola bolo použité čisté vehikulum (Krebsov roztok). Relaxácia bola zmeraná izometricky a vyjadrená ako percento z maximálne nožnej. Za maximálnu relaxáciu sme považovali tú, ktorá bola navodená na záver nitroprusidom sodným ($100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z najmenej 6 meraní, u kontrol 4 merania, krúžky v jednej skupine boli získané z rôznych zvierat. ns nesignifikantný rozdiel.



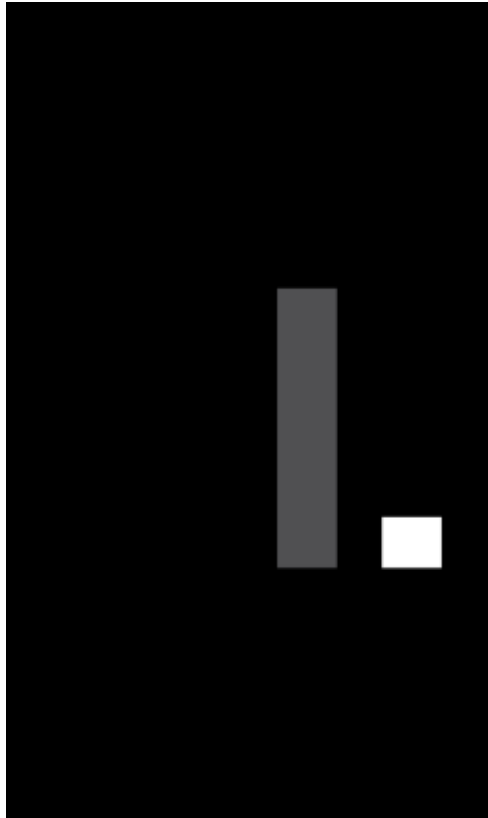
Graf 4. Vplyv aktivity cyklooxygenázy na vazodilatačný účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (3-HPAA).

Graf znázorňuje relaxáciu navodenú podaním 3-HPAA (1 mmol.l^{-1}) u krúžkov izolovanej prasacej koronárnej artérie *ex vivo* s celistvým endotelom. Krúžky boli inkubované v prítomnosti inhibítora cyklooxygenázy indometacínu ($10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Následne boli kontrahované pomocou KCl (40 mmol.l^{-1}) a relaxované 3-HPAA (1 mmol.l^{-1}). Ako kontrola boli použité krúžky s 3-HPAA bez indometacínu a ako negatívna kontrola bolo použité čisté vehikulum (Krebsov roztok). Relaxácia bola zameraná izometricky a vyjadrená ako percento z maximálneho možného. Za maximálnu relaxáciu sme považovali tú, ktorá bola navodená na záver nitroprusidom sodným ($100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z najmenej 6 meraní, u kontrol 4 merania, krúžky v jednej skupine boli získané z rôznych zvierat. ns nesignifikantný rozdiel.



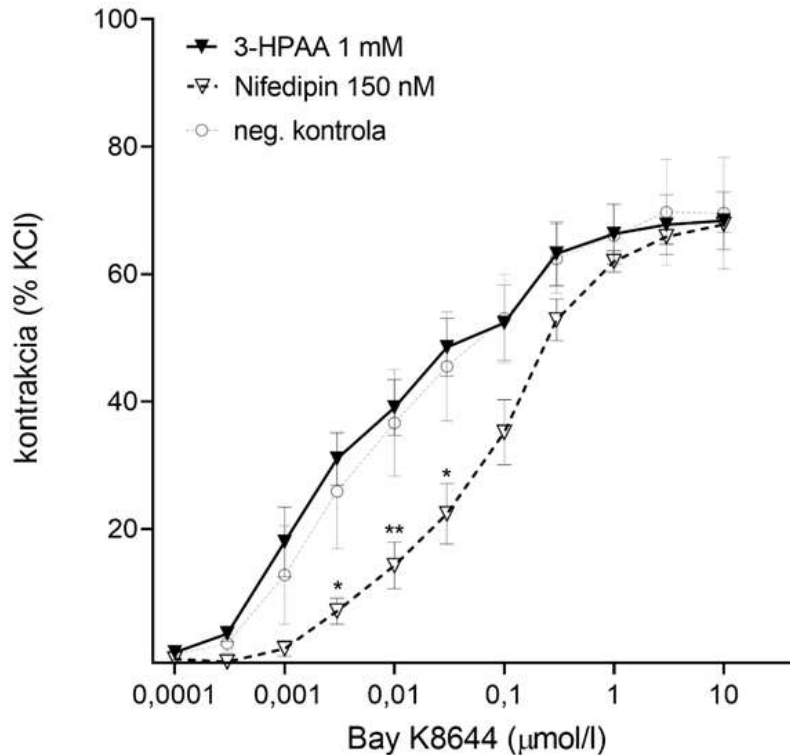
Graf 5. Vplyv aktivity endoteliálnych SK_{Ca} kanálov na vazodilatačný účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (3-HPAA).

Graf znázorňuje relaxáciu navodenú podaním 3-HPAA (1 mmol.l⁻¹) u krúžkov izolovanej prasacej koronárnej artérie *ex vivo* s celistvým endotelom. Krúžky boli inkubované v prítomnosti blokátora SK_{Ca} kanálov UCL-1684 (10 μmol.l⁻¹). Následne boli kontrahované pomocou KCl (40 mmol.l⁻¹) a relaxované 3-HPAA (1 mmol.l⁻¹). Ako kontrola boli použité krúžky s 3-HPAA bez UCL-1684 a ako negatívna kontrola bolo použité čisté vehikulum (Krebsov roztok). Relaxácia bola zmeraná izometricky a vyjadrená ako percento z maximálne možnej. Za maximálnu relaxáciu sme považovali tú, ktorá bola navodená na záver nitroprusidom sodným (100 μmol.l⁻¹). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM z najmenej 6 meraní, u kontrol 4 merania, krúžky v jednej skupine boli získané z rôznych zvierat. ns nesignifikantný rozdiel.



Graf 6. Vplyv aktivity endoteliálnych IK_{Ca} kanálov na vazodilatačný účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (3-HPAA).

Graf znázorňuje relaxáciu navodenú podaním 3-HPAA (1 mmol.l⁻¹) u krúžkov izolovanej prasacej koronárnej artérie *ex vivo* s celistvým endotelom. Krúžky boli inkubované v prítomnosti blokátora IK_{Ca} kanálov TRAM-34 (1 μmol.l⁻¹). Následne boli kontrahované pomocou KCl (40 mmol.l⁻¹) a relaxované 3-HPAA (1 mmol.l⁻¹). Ako kontrola boli použité krúžky s 3-HPAA bez TRAM-34 a ako negatívna kontrola bolo použité čisté vehikulum (Krebsov roztok). Relaxácia bola zmeraná izometricky a vyjadrená ako percento z maximálne možnej. Za maximálnu relaxáciu sme považovali tú, ktorá bola navodená na záver nitroprusidom sodným (100 μmol.l⁻¹). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM z najmenej 6 meraní, u kontrol 4 merania, krúžky v jednej skupine boli získané z rôznych zvierat. ns nesignifikantný rozdiel.



Graf 7. Vplyv inhibície vápnikových kanálov L-typu na vazodilatačný účinok kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej (3-HPAA).

Graf znázorňuje odpoveď krúžkov inkubovaných s 3-HPAA (1 mmol.l^{-1}) na kontrakciu vyvolanú kumulatívnymi dávkami aktivátora vápnikových kanálov L-typu Bay K8644 ($100 \text{ pmol.l}^{-1} - 10 \text{ μmol.l}^{-1}$) *ex vivo* na izolovanej prasacej koronárnej artérii s odstráneným endotelom. Ako pozitívna kontrola bol použitý blokátor vápnikových kanálov nifedipín (150 nmol.l^{-1}) a ako negatívna kontrola bolo použité čisté vehikulum (Krebsov roztok). Konstrikcia bola zmeraná izometricky a vyjadrená ako percento z maximálne možnej. Za maximálnu konstrikciu sme považovali tú, ktorá bola navodená na záver KCl (finálna koncentrácia 80 mmol.l^{-1}). Hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SEM z najmenej 7 meraní pre 3-HPAA, pre obe kontroly 4 merania, krúžky v jednej skupine boli získané z rôznych zvierat. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

7 DISKUSIA

Kardiovaskulárne ochorenia (KVO) sú najčastejšou príčinou úmrtia na celom svete a každý rok si vyžadajú skoro 18 miliónov životov. KVO predstavujú skupinu porúch srdca a krvných ciev. Správna identifikácia rizikových osôb a poskytnutie zodpovedajúcej liečby môže predchádzať predčasným úmrtiam (WHO 2023). Arteriálna hypertenzia predstavuje najrozšírenejší rizikový faktor KVO. Platí, že čím vyššie je celkové riziko KVO, tým prísnejšie by sa mal kontrolovať krvný tlak a skôr zahájiť liečbu. Avšak aj pri použití rôznych metód liečby sa často nepodarí dosiahnuť cieľové hodnoty krvného tlaku, preto je nutné neustále hľadať nové liečivá (Ghorani *et al.* 2022, Jordan *et al.* 2018). Ich štruktúry môžu vychádzať z prírodných látok.

Výskum podporuje rolu polyfenolov v prevencii kardiovaskulárnych ochorení a potenciál stravy bohatej na polyfenoly (napr. ovocie, čokoláda, čaj) pozitívne vplývať na cievne funkcie (Tsao 2010, Keane *et al.* 2016). Po konzumácii stravy obsahujúcej polyfenoly sa v tenkom čreve uvoľňujú ich aglykonové formy, ktoré podliehajú metabolizmu. Nevstrebané zvyšky rozkladá mikrobióm hrubého čreva a produkuje malé fenolové zlúčeniny, ktoré sú následne absorbované (Cassidy a Minihane 2017). Nedá sa jednoducho odporučiť konkrétne množstvo polyfenolov, ktoré by viedlo ku klinicky významným účinkom, pretože množstvo týchto látok v strave sa líši rovnako ako ich plazmatické hladiny. Vo všeobecnosti platí, že malé fenolové zlúčeniny sa nachádzajú v plazme vo vyšších koncentráciách než samotné pôvodné polyfenoly. Ich maximálne hladiny v plazme sa obvykle pohybujú od 1 do 615 nmol.l⁻¹, v niektorých prípadoch to môže byť až rádovo v μmol.l⁻¹ (Feliciano *et al.* 2016, Liu *et al.* 2022).

Táto práca vychádza už z hotového skríningu, ktorý testoval flavonoidy a ich malé kolonické metabolity. Skrínig potvrdil, že niektoré metabolity kvercetínu majú *in vitro* vazodilatačné účinky na periférne cievy vrátane koronárnych. Našou úlohou bolo, pre druhý najúčinnjší metabolit kyselinu 3-hydroxyfenyloctovú, overiť vazodilatačný účinok na koronárnych cievach a testovať jeho mechanizmus. Ako model sme zvolili prasacie koronárne artérie z čerstvých sŕdc, získané z miestneho bitúnku, kvôli podobnostiam kardiovaskulárneho systému u prasiat a človeka. Výhodou tohto modelu je tiež zníženie počtu používaných laboratórnych zvierat (princíp 3R).

Na základe skríningu 3-HPAA naozaj dilatovala prasacie koronárne cievy. Ako prvé sme zistili, že táto vazodilatácia je významne závislá na prítomnosti funkčného endotelu. No 3-HPAA bola schopná navodiť určitú dilatáciu aj bez prítomnosti

endotelu, čo znamená, že pravdepodobne pôsobí nielen na endotel, ale aj priamo na hladký sval. Pri následnom štúdiu sme sa sústredili hlavne na tie mechanizmy, ktoré sú spojené s cievnym endotelom.

Postupne sme zistili, že vazodilatačný účinok 3-HPAA je čiastočne závislý na aktivite eNOS a teda vzniku NO. Funkcia eNOS je kritická pre udržanie vaskulárnej homeostázy. Signalizácia NO priamo vedie k dilatácii krvných ciev aktiváciou hladkosvalovej sGC, čo vedie k zvýšeniu cGMP až postupne k relaxácii hladkého svalstva ciev. Pokiaľ je táto signalizačná os narušená, obmedzuje sa schopnosť vaskulatury a lokálnych štruktúr buď samotný NO produkovať alebo naň vhodne reagovať. Znížená biologická aktivita NO spôsobená redukciou aktivity eNOS a zvýšenou degradáciou sa radí medzi najdôležitejšie mechanizmy v multifaktoriálnom procese endoteliálnej dysfunkcie. Jedná sa o patologický proces týkajúci sa akútnych aj chronických stavov. Medzi hlavné rizikové faktory patrí vek, obezita a diabetes (Cyr *et al.* 2020, Dias *et al.* 2011).

pKa hodnota 3-HPAA je 4, čo znamená, že pri fyziologickom pH je látka prevažne v ionizovanom stave, čo bráni pasívnemu transportu cez membránu, hoci prítomnosť transportného systému nebola overená ani vylúčená. V ďalších krokoch sme preto testovali rovnako mechanizmy spojené s endoteliálnou membránou a aj s účinkami v cytozole. Aktivácia eNOS je často spustená zvýšením cytosolického Ca^{2+} . Ca^{2+} -aktivované draselné kanály (endoteliálne aj hladkosvalové) zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii vaskulárneho tonusu. Otvorenie endoteliálnych kanálov s malou a strednou vodivosťou (SK_{Ca} a IK_{Ca}) na plazmatickej membráne endotelových buniek zvyšuje influx Ca^{2+} do týchto buniek, čo vedie k aktivácii eNOS, následnej produkcii NO a teda k vazodilatácii (Wang *et al.* 2015). V našom experimente blokáda týchto kanálov pomocou UCL-1684 a TRAM-34 nemala vplyv na vazodilatačný účinok 3-HPAA. Nepodarilo sa nám teda preukázať, že by 3-HPAA aktivovala SK_{Ca} a IK_{Ca} .

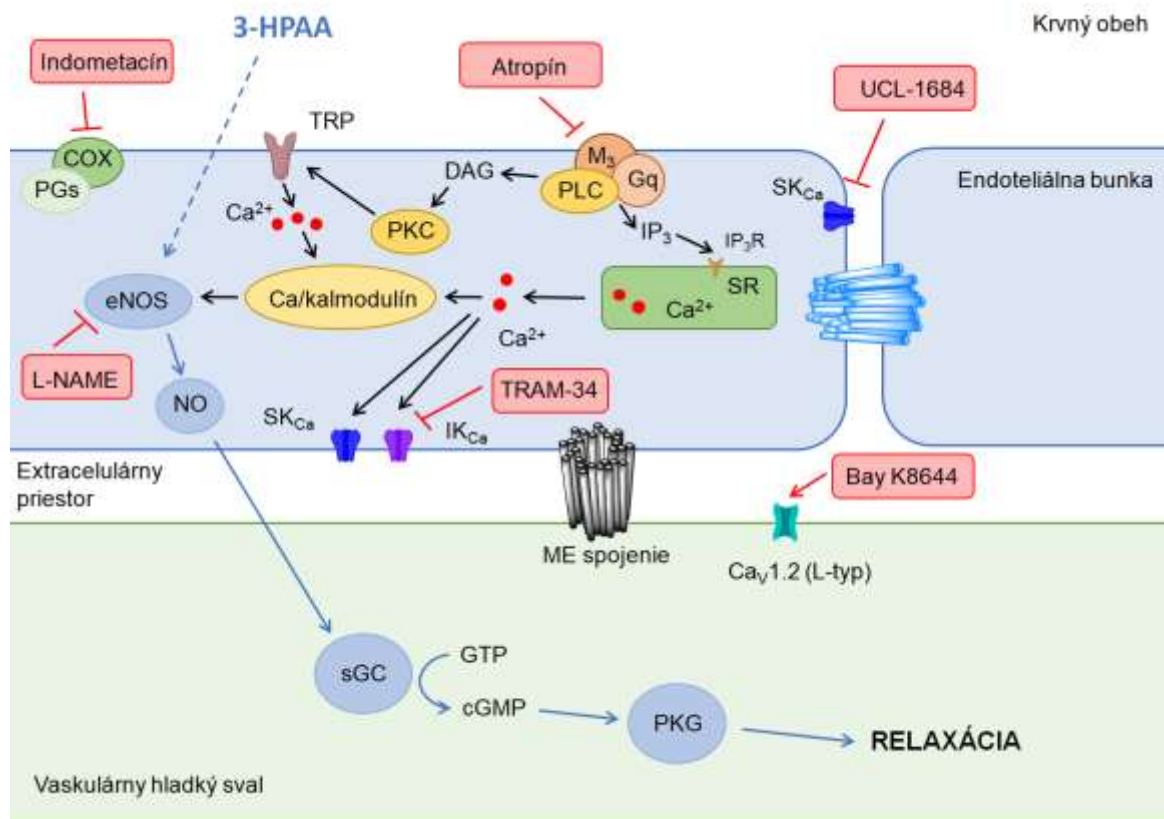
Ďalším testovaným miestom účinku boli endoteliálne muskarínové receptory. Acetylcholín je silný dilatátor ciev. Jeho aktivita je sprostredkovaná muskarínovými receptormi (M_1 až M_5) spojenými s G-proteínovou dráhou, ktoré spúšťajú uvoľňovanie samotných vazorelaxačných látok ako je NO. Receptory sú zoskupené podľa ich preferenčnej väzby, buď k mobilizácii intracelulárneho Ca^{2+} prostredníctvom aktivácie PLC (M_1 , M_3 , M_5) alebo k inhibícii AC (M_2 , M_4). Nepárne podtypy muskarínových receptorov sprostredkujú vazodilatáciu závislú

na endotele (Gericke *et al.* 2011). Experimentom sme zistili, že atropín, ktorý blokuje muskarínové receptory, nemal vplyv na vazodilatáciu navodenú 3-HPAA. Z toho vyplýva, že 3-HPAA na ne nepôsobí ako agonista.

V neposlednom rade môže byť vazodilatácia spôsobená okrem NO aj inými produktmi endotelu, napr. prostacyklínom (PGI₂). Spomedzi rôznych typov prostaglandínov je prostacyklín vo vaskulárnych tkanivách hlavným produktom kyseliny arachidonovej konvertovanej pomocou enzýmu cyklooxygenázy (COX). V zdravom endotele má hlavnú úlohu pravdepodobne COX-1. COX-2 je spojená s endotelovou dysfunkciou a s prozápalovými stavmi ako sú napr. vaskulárne poškodenia, kde látky odvodené od COX-2 často poskytujú ochranný účinok. PGI₂ hrá dôležitú úlohu v kardiovaskulárnom zdraví, má silné vazodilatačné účinky prostredníctvom relaxácie hladkého svalstva, kde sa na bunkovej membráne viaže na špecifické receptory typu G_s. Aktivácia AC zabezpečuje produkciu cAMP. Tým sa aktivuje PKA a dochádza k fosforylácii MLCK, čo zabraňuje jej účinku a interakcii medzi aktínom a myozínom vedúcej k vazokonstrikcii. (Wang *et al.* 2022, Dorris a Peebles 2012). V našom experimente sme zistili, že vazodilatačný účinok 3-HPAA nie je závislý na aktivite COX a teda vzniku vazodilatačných prostaglandínov (hlavne PGI₂), pretože blokáda COX antagonistom indometacínom nemala na účinok žiadny vplyv.

Pretože bol vazodilatačný účinok 3-HPAA na endotele závislý len čiastočne, rozhodli sme sa v poslednej časti práce overiť aj jeden z možných mechanizmov priamo na vaskulárnom hladkom svale. Membránové vápnikové kanály L-typu predstavujú hlavný zdroj extracelulárneho vápnika potrebného pre aktiváciu MLCK, ktorá aktivuje kaskádu umožňujúcu svalovú kontrakciu. 3-HPAA mohla byť antagonistom týchto kanálov. Experimentom sme však zistili, že prítomnosť 3-HPAA nemala na účinok aktivátora vápnikových kanálov L-typu Bay K8644 žiadny vplyv. Z toho usudzujeme, že 3-HPAA priamo neovplyvňuje vápnikové kanály L-typu.

Z našich výsledkov vyplýva, že na vazodilatačnom účinku 3-HPAA sa významne podieľa funkčný cievny endotel a aktívna eNOS. Zvýšenie tvorby NO nie je sprostredkované M receptormi, ani nie je priamo zviazané s aktivitou endoteliálnych draselných kanálov. Okrem toho 3-HPAA pravdepodobne pôsobí aj priamo na hladký cievny sval. Nejde však o priamy vplyv na influx extracelulárnych vápenatých iónov cez kanály L-typu a ani o účinok produktov COX. (Obr. 13)



Obr. 13 Schématické zobrazenie možného mechanizmu účinku kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej

SK_{Ca} – vápnikom aktivované draslíkové kanály s malou vodivosťou, IK_{Ca} – vápnikom aktivované draslíkové kanály so strednou vodivosťou, M_3 – muskarínové receptory typu 3, PLC – fosfolipáza C, DAG – diacylglycerol, PKC – proteínkináza C, IP_3 – inozitoltrifosfát, IP_3R – inozitoltrifosfátový receptor, SR – sarko/endoplazmatické retikulum, TRP – prechodné receptorové potenciálové kanály, $Ca/kalmodulín$ – komplex vápnika s kalmodulínom, COX – cyklooxygenáza, PGs – prostaglandíny, $eNOS$ – endoteliálna syntáza oxidu dusnatého, NO – oxid dusnatý, ME spojenie – myoendoteliálne spojenie, sGC – rozpustná guanylátcykláza, GTP – guanozíntrifosfát, $cGMP$ – cyklický guanozínmonofosfát, PKG – proteínkináza G, $Ca_v1.2$ (L-ty) – vápnikové kanály typu L

Konkrétny mechanizmus sa nám nepodaril odhaliť a budú potrebné ďalšie pokusy. 3-HPAA môže pôsobiť na iné iónové kanály priamo na hladkom svale. Zvlášť zaujímavé by bolo overiť jej vplyv na draselné kanály. Možný je aj vplyv na vnútrobunkové kaskády v hladkom svale, najmä tie, ktoré sú spojené s aktiváciou PKG a PKA .

Táto práca je súčasťou širšieho výskumu a vplyv 3-HPAA na krvný tlak bol už overený *in vivo* na hypertenzných potkanoch po intravenóznom podaní (pokusy

neboli súčasťou tejto diplomovej práce). Významný účinok na diastolický krvný tlak bol pozorovaný už po veľmi nízkej bolusovej dávke $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. To isté platilo v prípade systolického tlaku, ktorý výrazne poklesol po dávke $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Aj keď náš výskum overil vazodilatačné účinky 3-HPAA na *ex vivo* zvolenom modeli a sčasti poodhalil ich mechanizmus, pri interpretácii je potrebné si uvedomiť limity našej práce. Koronárne artérie majú medzi periférnymi cievami špecifické postavenie a ich reakcie na vazoaktívne látky sa nemusia zhodovať s ostatnými artériami v účinnej dávke a v zapojenom mechanizme. Okrem toho koronárna artéria nie je odporová cieva (pokles krvného tlaku je spojený s rozšírením odporových ciev).

Znalosť účinku vazoaktívnych látok na koronárne cievy je ale rovnako dôležitá, pretože niektoré KVS ochorenia cieľia primárne na srdce. Ďalej, účinná koncentrácia 3-HPAA je relatívne vysoká a dlhodobo ťažko dosiahnuteľná iba príjmom flavonoidov z potravy. K tomu si je ešte potrebné uvedomiť, že flavonoidy sa v reálnej situácii nemetabolizujú na jeden, ale na zmes rôznych metabolitov, ktoré môžu byť vazoaktívne a výsledný efekt ovplyvňuje ich vzájomná súhra. Pre overenie sú potrebné ďalšie pokusy, ktoré by testovali vplyv skupín metabolitov v klinicky reálnych koncentráciách.

8 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo otestovať mechanizmus vazodilatačného účinku kyseliny 3-hydroxyfenyloctovej *ex vivo* na izolovanej prasacej koronárnej artérii. Bolo zistené:

- Vazodilatačné účinky 3-HPAA sú čiastočne závislé na prítomnosti funkčného endotelu
- Vazodilatačné účinky 3-HPAA sú čiastočne závislé na aktivite endotelálnej eNOS
- Nebol preukázaný priamy vplyv 3-HPAA na endotelálne M receptory, na cyklooxygenázu a ani na endotelálne draselné kanály aktivované vápnikom IK_{Ca} a SK_{Ca}
- Nebol preukázaný priamy vplyv na hladkosvalové vápnikové kanály L-typu

9 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AL GHORANI, Hussam, Felix GÖTZINGER, Michael BÖHM a Felix MAHFOUD. Arterial hypertension – Clinical trials update 2021. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2022, **32**(1), 21-31. Dostupné z: doi:10.1016/j.numecd.2021.09.007
2. ALDERTON, Wendy K., Chris E. COOPER a Richard G. KNOWLES. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*. **357**(3) Dostupné z: doi:10.1042/0264-6021:3570593
3. AMES, Marisa K., Clarke E. ATKINS a Bertram PITT. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2018, **33**(2), 363-382. Dostupné z: doi:10.1111/jvim.15454
4. BREYER, Richard M., HATA, Aaron N., BREYER, Matthew D. Prostanoids. In: Offermanns, S., Rosenthal, W. (eds) *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2008. Dostupné z doi: 10.1007/978-3-540-38918-7_121
5. CANNON RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*. 1998;44(8 Pt 2):1809-19. Erratum in: *Clin Chem* 1998;44(9):2070.
6. CASSIDY, Aedín a Anne-Marie MINIHANE. The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2017, **105**(1), 10-22. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.116.136051
7. CIUMĂRNEAN, Lorena, Mircea Vasile MILACIU, Octavia RUNCAN, et al. The Effects of Flavonoids in Cardiovascular Diseases. *Molecules*. 2020, **25**(18). Dostupné z: doi:10.3390/molecules25184320
8. CYR, Anthony R., Lauren V. HUCKABY, Sruti S. SHIVA a Brian S. ZUCKERBRAUN. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Critical Care Clinics*. 2020, **36**(2), 307-321. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccc.2019.12.009
9. ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2004: 3-8, 69-78, 170. ISBN 80-2471-132-X.
10. ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2016: 23-24. ISBN 978-80-247-3817-8.

11. DENG, Jing Ti, Jacquelyn E. VAN LIEROP, Cindy SUTHERLAND a Michael P. WALSH. Ca²⁺-independent Smooth Muscle Contraction. *Journal of Biological Chemistry*. 2001, **276**(19), 16365-16373. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M011634200
12. DI LORENZO, Chiara, Francesca COLOMBO, Simone BIELLA, Creina STOCKLEY a Patrizia RESTANI. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 2021, **13**(1). Dostupné z: doi:10.3390/nu13010273
13. DIAS, Maria Celeste, Diana C. G. A. PINTO a Artur M. S. SILVA. Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*. 2021, **26**(17). Dostupné z: doi:10.3390/molecules26175377
14. DIAS, R. G., NEGRÃO, C. E., & KRIEGER, M. H... Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 96(Arq. Bras. Cardiol., 2011 96(1)), 68–75. Dostupné z doi: 10.1590/S0066-782X2011000100012
15. DÍTĚ, Petr. *Vnitřní lékařství: učebnice pro lékařské fakulty*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007: 12-14. ISBN 978-80-7262-496-6.
16. DORRIS, Stacy L. a R. Stokes PEEBLES. PGI 2 as a Regulator of Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*. 2012, **2012**, 1-9. Dostupné z: doi:10.1155/2012/926968
17. DYLEVSKÝ, Ivan, MRÁZKOVÁ Olga, DRUGA Rastislav. *Funkční anatomie člověka*. Praha: Grada, 2000: 187, 419-422, 441. ISBN 80-7169-681-1.
18. FELICIANO, Rodrigo P., Albert BOERES, Luca MASSACCESSI, Geoffrey ISTAS, M. Rita VENTURA, Cláudia NUNES DOS SANTOS, Christian HEISS a Ana RODRIGUEZ-MATEOS. Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2016, **599**, 31-41. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2016.01.014
19. FONTANA, Josef, a kol. *Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta se cvičebnicí*. Praha: 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, 2014. [online]. Dostupné z: <<http://fb.lt.cz/skripta/>> [cit. 18.11.2022]
20. FORSSMANN, W. The renal urodilatin system: clinical implications. *Cardiovascular Research*. 2001 **51**(3), 450-462. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6363(01)00331-5
21. GANONG, William. *Přehled lékařské fyziologie, 20. vydání*. Praha: Galén. 2005:83-85, 379-382, 597-602 . ISBN 80-7262-311-7

22. GERICKE, Adrian, Jan J. SNIATECKI, Veronique G. A. MAYER, Evgeny GOLOBORODKO, Andreas PATZAK, Jürgen WESS a Norbert PFEIFFER. Role of M₁, M₃, and M₅ muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011, **300**(5), H1602-H1608. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00982.2010
23. GLAVAŠ, Mladena, Agata GITLIN-DOMAGALSKA, Dawid DĘBOWSKI, Natalia PTASZYŃSKA, Anna ŁĘGOWSKA a Krzysztof ROLKA. Vasopressin and Its Analogues: From Natural Hormones to Multitasking Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(6). Dostupné z: doi:10.3390/ijms23063068
24. GOLIAS Ch, CHARALABOPOULOS A, STAGIKAS D, CHARALABOPOULOS K, BATISTATOU A. The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. *Hippokratia*. 2007;11(3):124-8.
25. GROSS, Myron. Flavonoids and Cardiovascular Disease. *Pharmaceutical Biology*. 2009, **42**(sup1), 21-35. Dostupné z: doi:10.3109/13880200490893483
26. GUPTA, Deepak K. a Thomas J. WANG. Natriuretic Peptides and Cardiometabolic Health. *Circulation Journal*. 2015, **79**(8), 1647-1655. Dostupné z: doi:10.1253/circj.CJ-15-0589
27. HOWL, John a Sarah J PAYNE. Bradykinin receptors as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2005, **7**(2), 277-285. Dostupné z: doi:10.1517/14728222.7.2.277
28. HÜGEL, Helmut M., Neale JACKSON, Brian MAY, Anthony L. ZHANG a Charlie C. XUE. Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine*. 2016, **23**(2), 220-231. Dostupné z: doi:10.1016/j.phymed.2015.12.012
29. Cho Y, Somer BG, Amatya A. Natriuretic peptides and their therapeutic potential. *Heart Dis*. 1999;1(5):305-28.
30. IMIG, John D. Eicosanoid blood vessel regulation in physiological and pathological states. *Clinical Science*. 2020, **134**(20), 2707-2727. Dostupné z: doi:10.1042/CS20191209

31. JORDAN, Jens, Christine KURSCHAT a Hannes REUTER. Arterial Hypertension. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2018. Dostupné z: doi:10.3238/arztebl.2018.0557
32. JUNQUEIRA, Carlos Uchoa, CARNEIRO, José, KELLEY, Robert O. Základy histologie. 7. vyd. Jinočany: H & H, 1997:184, 200-213. ISBN 80-85787-37-7
33. KEANE, Karen M, Trevor W GEORGE, Costas L CONSTANTINOU, Meghan A BROWN, Tom CLIFFORD a Glyn HOWATSON. Effects of Montmorency tart cherry (*Prunus Cerasus L.*) consumption on vascular function in men with early hypertension. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2016, **103**(6), 1531-1539. Dostupné z: doi:10.3945/ajcn.115.123869
34. KITTNAR, Otoman a kol. Lékařská fyziologie. 1. vyd. Praha: Grada, 2011:114-120, 161-187, 536-537. ISBN: 978-80-247-3068-4
35. KLABUNDE, Richard E. Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation. In: *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2019 . [online]. Dostupné z: <https://www.cvphysiology.com/Blood%20Pressure/BP026>. [cit. 2.1.2023]
36. Klabunde, Richard E.. Arachidonic Acid Metabolites (Prostaglandins and Related Compounds). In: *Cardiovascular Physiology concepts*, 2009. [online] Dostupné z: <<https://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF013>> [cit.21.12.2022]
37. KLENER, Pavel. *Vnitřní lékařství*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, c2011: 328-331 . ISBN 978-80-246-1986-6.
38. KONRÁDOVÁ, Václava, UHLÍK, Jiří, VAJNER, Luděk. Funkční histologie. 2. vyd. Jinočany: H & H, 2000:97-100, 115-122, 233. ISBN 80-86022-80-3
39. KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H & H, 2000: 87-100, 115-122, 233. ISBN 80-86022-80-3.
40. KUMAR SINGH, Amit, Céilia CABRAL, Ramesh KUMAR, et al. Beneficial Effects of Dietary Polyphenols on Gut Microbiota and Strategies to Improve Delivery Efficiency. *Nutrients*. 2019, **11**(9). Dostupné z: doi:10.3390/nu11092216
41. LA, Mylinh a Julianne J. REID. ENDOTHELIN-1 AND THE REGULATION OF VASCULAR TONE. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1995, **22**(5), 315-323. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1681.1995.tb02008.x

42. LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI, et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha : Galén, 2007: 297-298. ISBN 978-80-7262-373-0.
43. LIU, Shuhan, Feng LIN, Jian WANG, Xiaoqiang PAN, Liguang SUN a Wei WU. Polyphenols for the Treatment of Ischemic Stroke: New Applications and Insights. *Molecules*. 2022, **27**(13). Dostupné z: doi:10.3390/molecules27134181
44. LIU, Weixin, Yi FENG, Suhang YU, Zhengqi FAN, Xinlei LI, Jiyuan LI a Hengfu YIN. The Flavonoid Biosynthesis Network in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(23). Dostupné z: doi:10.3390/ijms222312824
45. LIU, Yujia, Takumi MYOJIN, Kexin LI, et al. A Major Intestinal Catabolite of Quercetin Glycosides, 3-Hydroxyphenylacetic Acid, Protects the Hepatocytes from the Acetaldehyde-Induced Cytotoxicity through the Enhancement of the Total Aldehyde Dehydrogenase Activity. *International Journal of Molecular Science*. 2022, **23**(3). Dostupné z: doi:10.3390/ijms23031762
46. LÜLLMANN, Heinz, MOHR, Klaus, WEHLING, Martin. *Farmakologie a toxikologie*. 2 vyd., české. Praha: Grada, 2004:101-103, 137-141, 157, 261-262, 447. ISBN: 80-247-0836-1
47. LÜSCHER TF, YANG Z, KIOWSKI W, LINDER L, DOHI Y, DIEDERICH D. Endothelin-induced vasoconstriction and calcium antagonists. *J Hum Hypertens*. 1992 Dec;6 Suppl 2:S3-8.
48. MARÍN, Laura, Elisa M. MIGUÉLEZ, Claudio J. VILLAR a Felipe LOMBÓ. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *BioMed Research International*. 2015, **2015**, 1-18. Dostupné z: doi:10.1155/2015/905215
49. MASOPUST, Jaroslav a kol. *Patobiochemie buňky*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003. 344 s. s. 88–92. ISBN 80-239-1011-6.
50. NAJMANOVÁ, Iveta, Jana POUROVÁ, Marie VOPRŠALOVÁ, Veronika PILAŘOVÁ, Vladimír SEMECKÝ, Lucie NOVÁKOVÁ a Přemysl MLADĚNKA. Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2016, **60**(5), 981-991. Dostupné z: doi:10.1002/mnfr.201500761

51. NAŇKA, Ondřej a Miloslava ELIŠKOVÁ. *Přehled anatomie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2015: 85-87. ISBN 978-80-7492-206-0.
52. ONO, Kenjiro, Mayumi TSUJI, Tritia R. YAMASAKI a Giulio M. PASINETTI. Anti-aggregation Effects of Phenolic Compounds on α -synuclein. *Molecules*. 2020, **25**(10). Dostupné z: doi:10.3390/molecules25102444
53. OZEN, G. a X. NOREL. Prostanoids in the pathophysiology of human coronary artery. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2017, **133**, 20-28 Dostupné z: doi:10.1016/j.prostaglandins.2017.03.003
54. PANCHE, A. N., A. D. DIWAN a S. R. CHANDRA. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016, **5**. Dostupné z: doi:10.1017/jns.2016.41
55. PATEL, Seema, Abdur RAUF, Haroon KHAN a Tareq ABU-IZNEID. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017, **94**, 317-325. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2017.07.091
56. PETROVICKÝ, Pavel. *Klinická neuroanatomie CNS*. Praha : Triton, 2008: 61-64.. ISBN 978-80-7387-039-3.
57. ROKYTA, Richard a kol. Fyziologie pro bakalářská studia v medicíně, přírodovědných a tělovýchovných oborech. Praha: ISV nakladatelství, 2000:47, 105, 249. ISBN: 80-85866-45-5
58. RUCKER, Dane, DHAMOON, Amit S. Physiology, Thromboxane A2. [Updated 2022 Sep 12]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817/> [cit. 21.12.2022]
59. SIMMONS, Daniel L., Regina M. BOTTING a Timothy HLA. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews*. 2004, **56**(3), 387-437. Dostupné z: doi:10.1124/pr.56.3.3
60. SINGH, Sukhman, Ishveen KAUR a Rupesh KARIYAT. The Multifunctional Roles of Polyphenols in Plant-Herbivore Interactions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, **22**(3). Dostupné z: doi:10.3390/ijms22031442
61. SPILKOVÁ, Jiřina a kol. Farmakognozie. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2016:102-105. ISBN: 978-80-246-3264-3

62. ŠTEJFA, Miloš a kol. Kardiologie. 3 přepracované a doplněné vyd. Praha: Grada, 2007:51-52, 284-286, 425. ISBN: 978-80-247-1385-4
63. ŠVIHOVEC, Jan a kol. Farmakologie. Praha: Grada, 2018:177-181, 321-323. ISBN: 978-80-271-2150-2
64. TANAKA, Yoshio, Katsuo KOIKE a Ligia TORO. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2004, **40**(4,5), 125-153. Dostupné z: doi:10.1540/jsmr.40.125
65. TENOPOULOU, Margarita, DOULIAS, Paschalis-Thomas. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-1190. Dostupné z doi: 10.12688/f1000research.19998.1
66. TOBLLI, Jorge, Federico DIGENNARO, Fernando GIANI JORGE a Dominici FERNANDO PABLO. Nebivolol: impact on cardiac and endothelial function and clinical utility. *Vascular Health and Risk Management*. Dostupné z: doi:10.2147/VHRM.S20669
67. TROJAN, Stanislav a kol. Lékařská fyziologie. 4. vyd. Praha: Grada, 2003:104, 180, 196-208, 230, 453, 483, 503, 572. ISBN: 80-247-0512-5
68. TSAO, Rong. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*. 2010, **2**(12), 1231-1246. Dostupné z: doi:10.3390/nu2121231
69. VAN NUETEN, J.M., W.J. JANSSENS a P.M. VANHOUTTE. Serotonin and vascular reactivity. *Pharmacological Research Communications*. 1985, **17**(7), 585-608. Dostupné z: doi:10.1016/0031-6989(85)90067-0
70. VARGAS-RODRIGUEZ, Jose R., Idalia GARZA-VELOZ, Virginia FLORES-MORALES, Jose I. BADILLO-ALMARAZ, Maria R. ROCHA-PIZAÑA, José J. VALDÉS-AGUAYO a Margarita L. MARTINEZ-FIERRO. Hyperglycemia and Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Pulmonary Function in the Context of SARS-CoV-2 Infection. *Frontiers in Medicine*. 2022, 8. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2021.758414
71. WALKER, Katharine, Martin PERKINS a Andy DRAY. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochemistry International*. 1995, **26**(1), 1-16. Dostupné z: doi:10.1016/0197-0186(94)00114-A

72. WANG, Lu, Yiqian WU, Zhanjun JIA, Jing YU a Songming HUANG. Roles of EP Receptors in the Regulation of Fluid Balance and Blood Pressure. *Frontiers in Endocrinology*. 2022, **13**. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2022.875425
73. WANG, Xiang-Chong, Wen-Tao SUN, Cheuk-Man YU, Shun-Hay PUN, Malcolm John UNDERWOOD, Guo-Wei HE a Qin YANG. ER stress mediates homocysteine-induced endothelial dysfunction: Modulation of IKCa and SKCa channels. *Atherosclerosis*. 2015, **242**(1), 191-198. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.021
74. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prístup online: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1 (cit. 27.3.2023)
75. ZABELA, Volha, Chethan SAMPATH, Mouhssin OUFIR, Veronika BUTTERWECK a Matthias HAMBURGER. Single dose pharmacokinetics of intravenous 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 3-hydroxyphenylacetic acid in rats. *Fitoterapia*. 2020, **142**. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2020.104526
76. ZEYNALOV, Emil, Susan M. JONES a J. Paul ELLIOTT. Vasopressin and vasopressin receptors in brain edema. In: *Vasopressin*. Elsevier, 2020, 2020, s. 291-312. Dostupné z: doi:10.1016/bs.vh.2019.08.015
77. ZHAO, Yingzi, VANHOUTTE, Paul M, LEUNG, Susan W. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*. 2015;129(2):83-94. Dostupné z doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002.