

**UNIVERZITA KARLOVA**

**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE**



**Štúdium vazodilatačného účinku  
tamarixetínu na modeli prasacej  
koronárnej cievy *ex vivo***

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce:

doc. PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

Barbora Gaidosová

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. Práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Študent: Barbora Gaidosová

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

Názov diplomovej práce: Štúdium vazodilatačného účinku tamarixetínu na modeli prasacej koronárnej cievy *ex vivo*.

Flavonoidy ako jedny z najčastejšie sa vyskytujúcich rastlinných obsahových látok sú známe svojimi priaznivými účinkami na ľudský organizmus a zvlášť kardiovaskulárny systém. Táto diplomová práca sa zaoberá vazodilatačným pôsobením flavonoidu tamarixetínu.

Cieľom práce bolo vykonať screening vazodilatačných účinkov na 10 obsahových látkach z hlohu. Zo screeningu vybrať látku vazodilatačne najúčinnjšiu a následne na nej overiť mechanizmus účinku. Experimenty prebiehali na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie. Ku prekontrahovaným kruhom artérie bola vo vzrastajúcich koncentráciách pridávaná skúšaná obsahová látka za súčasného sledovania vazodilatácie. Pri overovaní mechanizmu účinku boli použité inhibítory jednotlivých skúšaných mechanizmov.

Z výsledkov vyplynulo, že vazodilatačne najúčinnjšou látkou bol tamarixetín s hodnotou  $EC_{50} = 47,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Konkrétny mechanizmus účinku nebol potvrdený, avšak bolo zistené, že tamarixetín pravdepodobne ovplyvňuje L-typ napät'ovo závislých vápnikových kanálov na membráne buniek hladkého svalu. Jeho pôsobenie môže byť buď priame alebo nepriame cez vnútrobunkovú štruktúru ovplyvňujúcu L-typ vápnikových kanálov. Pre konkrétne zistenie mechanizmu účinku sú potrebné ďalšie experimenty.

## ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Barbora Gaidosová

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

Title of diploma thesis: Study of the vasodilatory effect of tamarixetin in an *ex vivo* porcine coronary vessel model.

Flavonoids, as one of the most common herbal substances, are known for their beneficial effects on the human organism and in particular on the cardiovascular system.

The aim of this thesis was to screen ten substances contained in hawthorn for vasodilatory effects, select the most active one, and subsequently verify mechanism(s) of its vasodilatory action. The experiments were conducted on an *ex vivo* vascular model using the pig coronary artery. In screening, the tested substance was always cumulatively added to the precontracted arterial rings at increasing concentrations while monitoring the vasodilatation. Vasoactive inhibitors or agonists of several vasodilatory pathways were used for verification of possible mechanism(s) of action.

The results showed that the most active vasodilatory substance was tamarixetine with an  $EC_{50}$  of  $47.8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . The detail mode of action has not been discovered however tamarixetine has been shown to influence the voltage dependent calcium channels of L-type on the vascular smooth muscle cell membrane. Its action may be either direct or indirect via an intracellular structure influencing the L-type calcium channels. Further experiments are needed to specify this mechanism of action.

## POĎAKOVANIE

Touto cestu by som chcela poďakovať svojej školiteľke PharmDr. Jane Pourovej, Ph.D. za ústretovosť, rady a odborné vedenie pri spracovaní tejto diplomovej práce.

Moje poďakovanie tiež patrí Patrícii Dias, MSc. a Saine Saadat, MSc. za spoluprácu na experimentálnej časti práce.

Ďalej by som chcela poďakovať mojej rodine a manželovi za podporu a povzbudenia počas celého štúdia.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ZOZNAM SKRATIEK .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČASŤ .....</b>	<b>11</b>
3.1	HLOH.....	11
3.2	FLAVONOIDY .....	12
3.3	TAMARIXETÍN.....	13
3.4	ZDROJE TAMARIXETÍNU .....	15
3.5	ÚČINKY TAMARIXETÍNU .....	18
3.5.1	GASTROINTESTINÁLNE ÚČINKY .....	18
3.5.2	KARDIOVASKULÁRNE ÚČINKY .....	19
3.5.3	DIURETICKÉ ÚČINKY .....	21
3.5.4	ALERGIA.....	21
3.5.5	ALZHEIMEROVA CHOROBA .....	21
3.5.6	ANTIOXIDAČNÉ ÚČINKY .....	22
3.5.7	ANTI-KANCEROGÉNNE ÚČINKY .....	23
3.5.8	ANTIMETASTATICKÉ ÚČINKY.....	25
3.5.9	INHIBIČNÉ ÚČINKY NA CYTOCHRÓMY P450.....	25
3.5.10	ANTIBAKTERIÁLNE ÚČINKY.....	25
3.6	FARMAKOKINETIKA TAMARIXETÍNU .....	26
3.7	PLAZMATICKÉ KONCENTRÁCIE .....	29
3.8	VASKULÁRNA FARMAKOLÓGIA .....	31
<b>4</b>	<b>CIEĽ A ZADANIE PRÁCE .....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>42</b>
5.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....	42
5.2	POUŽITÉ VYBAVENIE .....	42
5.2.1	CHEMIKÁLIE .....	42

5.2.2	POMÔCKY A PRÍSTROJE .....	44
5.3	METODIKA .....	45
5.3.1	PRIEBEH EXPERIMENTU .....	45
5.3.2	VYHODNOTENIE NAMERANÝCH ÚDAJOV .....	49
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>50</b>
6.1.1	SCREENING .....	50
6.1.2	MECHANIZMUS ÚČINKU NAJÚČINNEJŠEJ LÁTKY - TAMARIXETÍNU..	52
<b>7</b>	<b>DISKUSIA .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>LITERATÚRA .....</b>	<b>68</b>
	<b>ZOZNAM OBRÁZKOV.....</b>	<b>77</b>
	<b>ZOZNAM TABULIEK.....</b>	<b>78</b>

## 1 ZOZNAM SKRATIEK

4-AP	4-aminopyridín
ACE	angiotensín konvertujúci enzým
AT1	receptor 1 pre angiotenzín II
ATP	adenosintrifosfát
BACE 1	$\beta$ -sekretáza 1
BMMCs	mononukleárne bunky ľudskej kostnej drene
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CK	kreatín-kináza
CNP	natriuretický peptid C
CO	oxid uhoľnatý
COMT	katechol-O-metyl transferáza
COX-2	cyklooxygenáza 2
CYP	cytochróm P450
DMSO	dimetylsulfoxid
DT-3	špecifický inhibítor PKG 1Alfa
EDCF	endotelom produkovaný kontraktačný faktor
EDRF	endotelom produkovaný relaxačný faktor
eNOS	endoteliálna syntáza oxidu dusnatého
ETa	endotelínové receptory A
ETb	endotelínové receptory B
G2/M	kontrolný bod bunkového cyklu
GSH	glutathion
GTP	guanosintrifosfát
H <sub>2</sub> S	sulfán
HCA-7	ľudské bunky rakoviny hrubého čreva
HPLC-MS/MS	kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou
HSA	ľudský sérový albumín
IBX	iberiotoxín
IL-6	interleukín 6
IP3R	inositol-trifosfátový receptor
K <sub>ATP</sub>	ATP závislé draslíkové kanály



K <sub>Ca</sub>	draslíkové kanály aktivované vápnikom
K <sub>ir</sub>	vstupne rektifikované draslíkové kanály
K <sub>v</sub>	draslíkové kanály aktivované membránovým napätím
KVS	kardiovaskulárny systém
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou
MLCK	kináza ľahkého reťazca myozínu
MMP	matrixové metaloproteinázy
MW	molecular weight - molekulárna hmotnosť
NF- $\kappa$ B	nukleárny faktor kappa B
NNK	4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanon
NO	oxid dusnatý
NSCLC	nemalobunkový karcinóm pľúc
NTS	nitroprusid sodný
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]chinoxalín-1-on
PDE	fosfodiesteráza
pGC	membránová guanylátcykláza
PGE-2	prostaglandín E2
PKA	proteínkináza A
PKC	proteínkináza C
PXR	pregnanový receptor X
RAAS	renín-angiotenzín-aldosterónový systém
ROCK	Rho-asociovaná proteín kináza
ROS	reaktívne formy kyslíka
SEM	smerodatná odchýlka
sGC	solubilná guanylátcykláza
SS	salt sensitive - citlivý na soli
TAC	priečne zúženie aorty
TCM	tradičná čínska medicína
TNF-a	tumor nekrotizujúci faktor alfa
VLDL	lipoproteín s veľmi nízkou hustotou

## 2 ÚVOD

Kardiovaskulárny systém zabezpečuje základné životné funkcie ľudského organizmu ako je prietok okysličenej krvi tkanivami, transport živín, hormónov a odvod odpadných produktov. Taktiež reguluje krvný tlak a napomáha udržovaniu telesnej teploty.

Kardiovaskulárne ochorenia sú jednými z najčastejších príčin úmrtí vo svete, jedná sa hlavne o ischemickú chorobu srdca, mozgové cievne príhody, arteriálnu hypertenziu a infarkt myokardu. V Európe tvoria až 45% všetkých úmrtí a až 4 milióny ľudí zomrie ročne na kardiovaskulárne ochorenia (Townsend N et al. 2016).

Flavonoidy patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce rastlinné obsahové látky. Majú viacero pozitívnych účinkov na ľudský organizmus ako napríklad: antihyperlipidemické, antitrombotické, vazodilatačné, antioxidantné, antikancerogénne a gastroprotektívne. Táto práca sa zameriava hlavne na ich priaznivé pôsobenie v prevencii a terapii kardiovaskulárnych ochorení, a to konkrétne na látku tamarixetín a jej vazodilatačné účinky.

Prvá časť práce obsahuje zhrnutie teoretických poznatkov o flavonoidoch, zvlášť je zameraná na látku tamarixetín, jej štruktúru, zdroje, farmakokinetiku a účinky na ľudský organizmus. Ďalej sú v nej popísané jednotlivé komponenty, ktoré sa zúčastňujú mechanizmu vazodilatácie a vazoaktívne látky, čo je dôležité pre pochopenie experimentálnej časti. Experimentálna časť práce obsahuje screening vazodilatačných účinkov vybraných obsahových látok z hlohu. Tamarixetín bol zo screeningu vybraný ako najúčinnjší a preto sa následne skúmal mechanizmus jeho účinku. Experiment bol vykonávaný na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie.

## 3 TEORETICKÁ ČASŤ

### 3.1 Hloh

Rastlinný druh hloh, latinským názvom pre rod *Crataegus*, má rôzne druhy - *pinnatifida*, *laevigata*, *monogyna* a *oxyacantha*, *scabrifolia* z čeľade ružovité – *Rosaceae*. Je vždyzelený trnitý malý strom alebo ker dorastajúci do výšky 5 až 15 metrov. Plody sú červené, čierne alebo žlté malvice (Martinelli F et al. 2021).

Hloh a hlavne plod z neho sa v tradičnej (pre oblasti Ázia, Amerika a Európa) medicíne používa na ochorenia kardiovaskulárneho a tráviaceho systému. Medzi jeho hlavné pôsobenia sa zaraďuje antioxidačné, antibakteriálne, antihyperlipidemické a hepatoprotektívne. Hloh sa terapeuticky využíva hlavne v kardiovaskulárnych indikáciách ako angína pectoris, arytmia, hypertenzia a kongestívne srdečné zlyhanie. Najviac obsahových látok obsahujú plody, červené aj zelené listy a kvety hlohu. Obsahové látky sú hlavne flavonoidy, fenyylpropanoidy, lignany, saponíny, vitamín C, proantokyanidíny, triterpenoidy a glykozidy (LiverTox 2023). Odporúčaná denná dávka vodne-etanolického extraktu z listov a kvetov hlohu je 160-900 mg rozdelená do dvoch až troch dávok. Táto dávka bola schválená na základe publikovaných dát ukazujúcich pozitívny prínos pre pacientov klasifikovaných v skupine NYHA II (Rigelsky JM a Sweet BV 2002).

Vo vzťahu ku kardiovaskulárnemu systému sú známe tieto účinky:

Antioxidačné účinky:

Flavonoidy obsiahnuté v hlohu s vysokým počtom hydroxylových skupín vo svojej štruktúre sú zodpovedné za vysokú schopnosť absorbovať kyslíkový radikál - antioxidačné vlastnosti v prevencii KVS (kardiovaskulárnych) ochorení.

V pokuse na potkanoch bolo pozorované, že extrakt z hlohu v synergickom účinku s vitamínom C má antioxidačné účinky, ktoré boli zodpovedné za prevenciu hypertenzie u potkanov vystavených teplu a námahe. Predpokladaný mechanizmus účinku je udržiavanie normálneho systolického a diastolického tlaku zachovaním redoxnej homeostázy teda odbúravanie oxidačného stresu, prevencia poškodenia endotelu ciev a generovanie NO (oxidu dusnatého), potláčanie zápalových procesov (cez znižovanie

hladiny zápalových mediátorov IL-6 (interleukín 6), TNF- $\alpha$  (tumor nekrotizujúci faktor alfa), NF- $\kappa$ B (nukleárny faktor kappa B) (Du W et al. 2022).

Antihyperlipidemické účinky:

Bol pozorovaný pozitívny vplyv druhu *Crataegus pinnatifida* u pacientov s metabolickým syndrómom, teda súborom rizikových faktorov napríklad hypertenzia, obezita, dyslipidémia a hyperglykémia. Flavonoidy z listov redukovali oblasti arteriosklerotických lézií, triterpenické kyseliny viedli k zníženiu hladín u LDL (lipoproteín s nízkou hustotou) a VLDL (lipoproteín s veľmi nízkou hustotou) (Dehghani S et al. 2019).

Vazodilatačné účinky:

Extrakt z hlohu pôsobí na cievny hladký sval ale aj na endotelové bunky. Extrakt z *Crataegus tanacetifolia* spôsobuje vazodilatáciu preddepodobne zvyšovaním syntézy a vylučovania NO v bunkách endotelu (Verma T et al. 2021). Dve účinné látky obsiahnuté v plode hlohu - kyselina jablčná a asparágová indukovali tvorbu NO a zvýšenie aktivity eNOS (endoteliálna syntáza NO) a tým tlmili príznaky hypertenzie vyvolanej u SS (salt sensitive) potkanov (Zheng X et al. 2019). Kardiovaskulárne účinky u hlohu sú tradične známe avšak nie sú popísané obsahové látky zodpovedné za tento účinok a ani jeho presný mechanizmus. Vybraná obsahová látka z hlohu bola z tohto dôvodu testovaná v tejto diplomovej práci.

## 3.2 Flavonoidy

Flavonoidy predstavujú jednu z najrozšírenejších skupín z rastlín pochádzajúcich sekundárnych metabolitov fenolického pôvodu. Vyskytujú sa vo väčšine rastlín, v ovoci a zelenine. Flavonoidy sa tiež často identifikujú ako pigmenty, ktoré sú zodpovedné za sfarbenie listov. Ich vysoký obsah bol zaznamenaný v červenom víne, olivovom oleji, čaji, citrusovom ovoci alebo v semenách rastlín (Middleton E Jr et al, 2000).

Uhlíkový skelet flavonoidov predstavuje C6-C3-C6 usporiadanie. Základ chemickej štruktúry flavonoidov tvoria dva aromatické kruhy A a B, ktoré sú spojené cez trojuhlíkatý reťazec, ktorý vytvára kyslík obsahujúci heterocyklický kruh (heterocyklus pyran) spojený s kruhom A (Chagas MDSS et al. 2022).

Tento heterocyklus sa nazýva 2-fenylbenzopyron, kde prebiehajú metylácie a hydroxylácie, prípadne jednotlivé flavonoidy môžeme rozlíšiť na základe pripojeného cukru (Woodman OL a Chan ECH 2004).

Rôzne usporiadanie kruhov vedie k odlišnostiam pri metabolických procesoch ako sú hydrogenácia, sulfatácia, hydroxylácia, metylácia alebo glykozylácia, čo spôsobuje odlišnosti vo farmakologickom účinku metabolitov (Chagas MDSS et al. 2022).

Flavonoidy sa podľa ich štruktúry delia na niekoľko podskupín: flavóny, flavonoly, flavanóny, flavanoly, flavanonoly, katechíny, antokyány a chalkóny (Panche AN et al. 2016).

Flavonoly, medzi ktoré sa zaraďuje skúmaná látka tamarixetín vo svojej štruktúre obsahujú ketonickú skupinu, na kruhu C majú v polohe 3 hydroxylovú skupinu, ktorá môže byť glykosylovaná (Panche AN et al. 2016).

Flavonoidy sa väčšinou vyskytujú v podobe glykozidov, k ich hydroxylovým skupinám (ku aglykónom) sú pripojené konjugáty - glykóny. Sú to práve cukorné časti flavonoidov, ktoré určujú ich metabolizmus, absorpciu a distribúciu. Väčšina flavonoidov môže byť absorbovaná v tenkom alebo hrubom čreve až po odstránení glykónovej časti štruktúry. Avšak nie je to pravidlom ako je možné vidieť pri vstrebávaní quercetrínu enterocyty. Vstrebávanie flavonoidov v črevách prebieha pomocou viacerých mechanizmov. Za vstup flavonoidov do intestinálnych buniek sú zodpovedné napríklad aj glukózové transportéry SGLT1 a GLUT1. Glykozid najčastejšie sa vyskytujúceho sa a teda aj najviac preskúmaného flavonoidu quercetínu quercetrín je transportovaný do buniek hrubého a tenkého čreva týmito transportérmi (Li S et al. 2020).

V priebehu rokov boli dokázané rôzne priaznivé účinky flavonoidov na ľudský organizmus ako napríklad znižovanie plazmatických hodnôt LDL, inhibícia agregácie krvných trombocytov, inhibícia bunecnej proliferácie alebo vychytávanie voľných radikálov (Woodman OL a Chan ECH 2004).

### **3.3 Tamarixetín**

Celý chemický názov tamarixetínu je 4'-O-methylquercetin, quercetin 4'-methyl éter alebo 3,5,7,3'-tetrahydroxy-4'-methoxy flavonol (Chan EWC et al. 2021). Je to teda flavonoidový O-metylovaný derivát quercetínu (Darsandhari S et al. 2021).

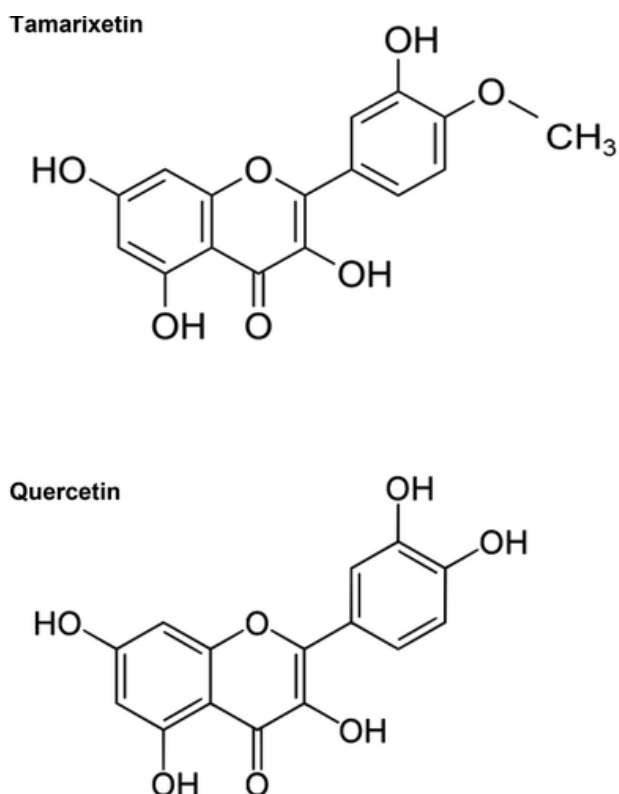
Jeho molekulárny vzorec je  $C_{16}H_{12}O_7$ . Tamarixetín má štyri hydroxylové skupiny pripojené na 2-fenylbenzopyronový skelet v polohách C3, C5, C7 a C3' a methoxy skupinu v polohe 4' (vid' Obr. 1) (Alsharairi NA 2023).

Tamarixetín je metabolit quercetínu vytvorený v malých množstvách *in vivo* pomocou enzýmu katechol-o-methyl transferáza (Moalin M et al. 2012).

Quercetín je jeden z najbežnejšie v strave prijímaných flavonoidov pričom jeho zastúpenie je približne 60%. Quercetín je známy svojou účinnosťou pri viacerých ochoreniach. Jeho najviac zdokumentované účinky sú antioxidačný, antiagregačný a vazodilatačný, antihypertenzívny, hypertrofiu redukujúci účinok, ktoré spôsobujú jeho kardioprotektívny efekt (Pérez-Vizcaíno F et al. 2002).

Quercetín sa metabolizuje v najväčšom množstve v pečeni a tenkom čreve (Stainer AR et al. 2019). Predpokladá sa, že O-metylácia quercetínu prebieha v pečeni kvôli vysokému výskytu tamarixetínu v žlči (Manach C et al. 1997). COMT (catechol-o-metyltransferáza) katalyzuje prenos metylového zvyšku z donorovej zlúčeniny s-adenosylmethionínu (Sak K et al. 2017).

Metylácia quercetínu, ktorá prebieha na voľných hydroxyloch zvyšuje metabolickú stabilitu produktu, jeho biodostupnosť a tiež jeho vlastné antikancerogénne vlastnosti (Darsandhari S et al. 2021).



**Obr. 1: Štruktúra tamarixetínu a quercetínu**

Prevzaté z: Hee JP et al. 2018

Keďže COMT preferuje 3'-O-methyláciu pred 4'-O-methyláciou, ku tvorbe ďalšieho quercetínového metabolitu isorhamnetínu dochádza častejšie než ku tvorbe tamarixetínu (Lomozová et al. 2021). Pomer quercetínu samotného a jeho metabolitov isorhamnetínu a tamarixetínu v plazme po chronickej administrácii potkanom bol 1:5:1 (Pérez-Vizcaíno F et al. 2002). U človeka po podaní 1095 mg quercetínu sa namerali hodnoty quercetínu, isorhamnetínu a tamarixetínu v pomere 40:6:13 ( $1,60 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ;  $0,24 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ;  $0,52 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) (Guo Y et al. 2013).

Dnes sa tamarixetín získava izoláciou z rastlín alebo pomocou chemickej syntézy, selektívnej metylácie 7-O-benzylquercetínu tetraacetátu a selektívnej protekcie/deprotekcie 3', 4'-katecholu quercetínu (Shen J et al. 2019).

### 3.4 Zdroje tamarixetínu

Výskyt flavonoidov v rastlinách závisí častokrát na prírodných vonkajších faktoroch, ktoré ovplyvňujú pozitívne alebo negatívne rastlinný metabolizmus. Jedná sa

o faktory ako: teplotné podmienky, ultrafialové žiarenie, ročné obdobie, stres spôsobený znečistením prostredia, suchosťou alebo slanosťou pôdy (Chagas MDSS et al. 2022).

Zastúpenie quercetínu a jeho derivátov je v rastlinách časté s výnimkou tamarixetínu, ktorý je pomerne vzácny (Peng W et al. 2005). Nasleduje prehľad niektorých zdokumentovaných rastlinných zdrojov tamarixetínu.

Prvá zmienka o tamarixetíne je z roku 1954, kedy ho Gupta a Seshadri izolovali z *Tamarix troupii*. V súčasnosti sa syntetizuje alebo izoluje z rastlín (Parajuli P et al. 2018).

V sedemdesiatych rokoch 20. storočia bol izolovaný z rastlinného materiálu *Astragalus miser* var. *Oblongifolius* (rod kozinec z čeľade *Fabaceae*, ľudový názov rastliny je vika jedovatá) (Shen J et al. 2019).

Charakteristickým rastlinným zdrojom látky tamarixetín je rod *Tamarix*, ktorý sa bežne používa v tradičnej medicíne pre jeho antioxidantné a antibakteriálne pôsobenie. Rod *Tamarix* má približne 60 rastlinných druhov (Niaz a et al. 2021).

Jednou z rastlín druhu *Tamarix*, ktorá obsahovala tamarixetín je *Tamarix ramosissima* a konkrétne list tejto rastliny (tamariška kaspická z čeľade *Tamaricaceae*, ktorá bola pozorovaná pre jej antioxidantné a antibakteriálne vlastnosti (Sultanova N et al. 2001).

Tamarixetín bol izolovaný aj z rastlinnej drogy, ktorá sa používa v tradičnej egyptskej medicíne, listy *Tamarix nilotica* - tamariška nílka z čeľade *Tamaricaceae* (Abouzeid SF et al. 2009).

Ďalšou rastlinou používanou v ľudovom liečiteľstve, konkrétne pre jej antihyperglykemické pôsobenie, ktorá obsahuje tamarixetín sa ukázal *Tamarix dioica* z čeľade *Tamaricaceae* pričom extrakt sa získaval z celej rastliny (Niaz A et al. 2021).

Rastlinná droga, z ktorej sa podarilo izolovať tamarixetín je Xiheliu, je to vetvička z rastliny *Tamarix chinensis* s čínskym názvom Chengliu bežne používaná v čínskej ľudovej medicíne. Pri sledovaní účinnosti a fytochemického zloženia tejto látky sa zistilo, že hlavnými súčasťami a zároveň účinnými látkami sú flavonoidy, medzi nimi aj tamarixetín (Xu F et al. 2014).

Izolácia tamarixetínu prebehla tiež z rastlinnej drogy bungo perak-perak, ide o listy z rastliny *Begonia versicolor* (rod begónia z čeľade *Begoniaceae*) (Abriyani E et al. 2014).



Prítomnosť tamarixetínu spolu s inými flavonoidmi bola identifikovaná v extrakte z rastlinnej drogy *Sophorae flos* - púčiky *Sophora japonica* - sofora japonská z čeľade *Fabaceae* (Chen QC et al. 2010).

Rastlinná droga púčiky z *Cleistocalyx operculatus* (súčasný názov *Syzygium nervosum*) rod klinčekovec z čeľade *Myrtaceae*, z ktorej boli flavonoidy izolované po prvý krát, tiež obsahovala tamarixetín (Min BS et al. 2010).

Jedným z izolovaných glykozidov tamarixetínu bol tamarixetin 3-O-B-D-glukopyranosid. Táto látka bola izolovaná z extraktu z čerstvých zreých listov *Azadirachta indica* (rod nimbovník alebo Neem z čeľade *Meliaceae*) (Yadav DK et al. 2017).

Prítomnosť rôznych flavonoidov vrátane tamarixetínu bola pozorovaná v mozgovom tkanive a plazme potkanov po podaní extraktu z *Hypericum perforatum* (ľubovník bodkovaný z čeľade *Hypericaceae*) (Paulke A et al. 2006).

Ďalším rastlinným zdrojom, ktorý bol použitý na izoláciu tamarixetínu je extrakt z drogy *Inulae flos* (*Inula japonica* - oman japonský z čeľade *Asteraceae*) (Shunli P et al. 2021).

Pri skúmaní účinnosti prostriedku tibetský Hongjingtian z TCM (tradičnej čínskej medicíny) pri ochorení COVID-19 (cieľom bol imunoregulačný a protizápalový účinok) sa analyzovalo bioaktívne zloženie rastliny rozchodnica vrúbkovaná z čeľade *Crassulaceae*. Rastlina obsahuje veľa druhov flavonoidov a medzi najzastúpenejšími aj tamarixetín (Wang L et al. 2021).

Ďalším zdrojom tamarixetínu sa ukázal plod rakytníka rešetliakového - *Hippophaë rhamnoides L.* z čeľade hlošinovité - *Elaeagnaceae* (Suomela JP et al. 2006).

*Blumea balsamifera* (ako droga sa používa list) z čeľade *Asteraceae*, ktorá sa využíva v ľudovom ázijskom liečiteľstve v terapii urolitiáz má medzi účinnými látkami zaradený tamarixetín (Nessa F et al. 2010).

Rastlina, ktorá sa ukázala ako bohatý zdroj polyfenolov je *Ficus carica* - figovník obyčajný (čeľaď *Moraceae*) a jeho plod tuniská figa. Tamarixetín bol v tejto rastline identifikovaný po prvýkrát (Soltana H et al. 2018).

Flavonoidy a antokyanidíny sú okrem iného zodpovedné za zafarbenie lupeňov rastlín. Tamarixetín bol tiež identifikovaný ako pigment v okvetných lístkoch repky olejnej -

*Brassica napus* z čeľade *Brassicaceae*. Najvyššie zastúpenie mal v kultivaroch s bielymi a žltými okvetnými lístkami (Zeng H et al. 2023).

Tamarixetín a jeho glykozidy a deriváty boli identifikované po prvý krát v rastline *Scabiosa stellata* L. (rod svrab, čeľaď *Caprifoliaceae*) konkrétne v etanolickom extrakte z usušenej celej rastliny, často používanej v tradičnej marockej medicíne (Rahmouni N et al. 2018).

Keďže tamarixetín a mnoho ďalších flavonoidov bolo vyvinutých obmenou štruktúry (metyláciou) quercetínu, boli snahy o zdokonalenie metód na ich izolovanie z dôvodu náročnosti chemickej syntézy a toxických reagensov. Jednou z dokonalejších metód sa ukázala mikrobiálna transformácia, ktorá prebieha jednoducho a v miernejších podmienkach. Hlavným krokom tohto procesu bola *Escherichia coli*, ktorá obsahovala methyltransferázový gén GerMIII. Optimalizáciou tohto procesu sa umožnila efektívna biokonverzia quercetínu na tamarixetín (Darsandhari S et al. 2020).

## 3.5 Účinky tamarixetínu

### 3.5.1 Gastrointestinálne účinky

Na tamarixetíne boli pozorované gastroprotektívne účinky. Na myšom modeli, ktorý mal indometacínom vyvolanú gastrickú ulceráciu sa orálne 30 minút pred podaním indometacínu podávali dávky 15 a 25mg tamarixetínu na kilogram váhy. Na kontrolnej skupine bez premedikácie boli pozorované rozsiahle lézie na dne žalúdka hodnotené pomocou ulcer indexu. Premedikované modely mali dokázané zníženie príznakov na viditeľných hemoragických léziách, obnovenie poškodenej epiteliálnej, mukóznej aj submukóznej vrstvy, vrátane zníženia infiltrácie zápalových buniek do submukóznej vrstvy (Yadav DK et al. 2017).

PXR (pregnanový receptor X) je jaderný receptor, ktorý je exprimovaný vo viacerých tkanivách tráviaceho traktu ako napríklad pečeni, dvanástniku, lačníku, bedrovníku a tiež v hrubom čreve. Funkciou tohto receptora je okrem iného aj regulovať transkripciu génov dôležitých pri metabolizme liečiv ako napríklad CYP3A4 a CYP3A5 (cytochróm P450 3A4 a 3A5) a tiež zapojených v transporte liečiv ako p-glykoproteín. Aktivácia PXR receptora má potenciál v terapii rôznych zápalových črevných ochorení ako napríklad

Crohnova choroba . Tamarixetín sa ukázal ako aktivátor tohto receptora a teda induktor spomenutých CYPov (Lau AJ a Chang TK 2015).

### 3.5.2 Kardiovaskulárne účinky

Tamarixetín spolu s ďalšími metabolitmi quercetínu (isorhamnetínom a kaempferolom) disponujú vazodilatačnou aktivitou v cievach, ktoré boli vopred kontrahované pomocou noradrenalínu (Alizadeh SR a Ebrahimzadeh MA 2022).

Táto aktivita bola ako dávkovo závislá pozorovaná aj v ďalších štúdiách flavonoidmi indukovanej vazodilatácii a to konkrétne na thorakálnej aorte a na mesenterickej artérii, ktorá zaznamenávala vyššiu relaxačnú odpoveď ciev. Účinok na cievy bol silnejší v odporových artériách než v artériách vodivostných. Viacero štúdií sa zaoberalo vplyvom prijímania flavonoidov pomocou potravy a mortalitou spôsobenou ischemickou chorobou srdca (Pérez-Vizcaíno F et al. 2002).

Tamarixetín má dokázanú protizápalovú a antioxidačnú aktivitu pri viacerých ochoreniach. Na TAC (pričné zúženie aorty) myších modeloch tamarixetín dokázal zmierniť hypertrofiu srdečného myokardu spôsobenú hypertenziou. Srdečná dysfunkcia, ktorá je dôsledkom chronickej hypertrofickéj remodelácie srdca, má často za následok zlyhanie srdca a smrť. Hypertrofia, ktorá bola vyvolaná pôsobením fenylefrínu na *in vitro* H9C2 kardiomyocytoch mal tamarixetín inhibičnú aktivitu závislú na dávke. Účinkom tamarixetínu bolo zníženie expresie génov zodpovedných za tvorbu fibrotického tkaniva, potlačenie apoptózy a oxidačného stresu (Fan C et al. 2019).

Pri štúdiu aktivity quercetínu a tamarixetínu v *in vitro* aj *in vivo* prostredí sa quercetín najprv metabolizoval na tamarixetín v trombocytoch pomocou COMT a následne sa sledovali jeho účinky na kardiomyocytoch. Účinky boli kardiotonické (inotropické) pričom konkrétny mechanizmus bol zvýšenie výmeny vápnika v kardiomyocytoch a tiež zrýchlenie skracovania sarkomér, tento účinok je podobný pôsobeniu obsahových látok z rastliny rodu *Digitalis* (inhibícia  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy) nasleduje teda zvýšenie hladiny  $\text{Na}^+$  iónov a spomalenie prechodu  $\text{Ca}^{2+}$  iónov cez  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výmenníkový systém, čo spôsobuje zadržanie  $\text{Ca}^{2+}$  vo vnútri sarkoplazmatického retikula. Inhibícia  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPázy môže dokonca podporovať vstup  $\text{Ca}^{2+}$  pomocou sarkolemálneho  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výmenníku. Vo výsledku sa zvyšuje diastolický vápnik a aj množstvo  $\text{Ca}^{2+}$  v sarkoplazmatickom retikule, čo vedie k pozitívnemu inotropnému účinku. Pokiaľ sa ale

obsah  $\text{Ca}^{2+}$  v sarkoplazmatickom retikule zvýši príliš (kardioglykozidová toxicita), môže spontánne uvoľňovanie  $\text{Ca}^{2+}$  z retikula počas diastoly aktivovať výmenu  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  opačným smerom, čo vedie k oneskoreným depolarizáciám a následným dysrytmiám (Hayamizu K et al. 2018), (Ritter JM et al. 2020).

V tejto štúdií ako ďalšiu kardioprotektívnu aktivitu tamarixetín vykazoval inhibíciu sekrécie serotonínu a tiež agregáciu trombocytov stimulovanú kolagénom. Kolagén je kľúčová látka v tvorbe hemostatickej odpovede cievy na zranenie. Fyziologická funkcia trombocytov je agregovať sa v prítomnosti poranenia cievnej steny a zabráňovať strate krvi vytvorením krvnej zátky. Trombus môže spôsobiť oklúziu cievy v srdci alebo mozgu, kde môže mať takáto situácia za následok vznik cievnej mozgovej príhody alebo infarkt myokardu (Bye AP et al. 2016).

Vyššie spomenuté krvné trombocyty sú kľúčové bunky v tvorbe hemostatickej odpovede cievy. Na zastavenie krvácania je potrebné aby sa vytvoril doštičkový agregát, ktorého tvorba je spustená interakciou receptorov s kolagénom a následnou aktiváciou mediátormi ako tromboxan A<sub>2</sub>, adenosin-difosfát a trombín, ktoré sú ako aktivátory receptoru spojeného s G-proteínom zodpovedné za spätnú väzbu a agregáciu. S týmto procesom sa spája aj mobilizácia vápnika, aktivácia integrínu a sekrécia granúl. Schopnosť flavonoidov teda aj tamarixetínu inhibovať kolagénom stimulovanú agregáciu doštičiek môže ovplyvňovať ich miera interakcie s plazmatickými prenášačovými proteínmi - ľudským sérovým albumínom. Tamarixetín ukázal spomedzi sledovaných látok (quercetín s metabolitom tamarixetínom, naringenín a apigenín) najvyššiu afinitu k HSA (ľudský sérový albumín). Tento potenciál viazať sa na plazmatické proteíny závisí do veľkej miery od štruktúry metabolitu konkrétne na hydroxylových, methoxy skupinách a zvyškoch glykozidov a na prítomnosti väzby C2-C3 v kruhu A (Wright B et al. 2013).

Boli popísané viaceré mechanizmy antitrombotického účinku tamarixetínu: inhibícia sekrécie granúl z trombocytov, ktoré uvoľňujú ATP, inhibícia afinity integrínu, na ktorý sa viaže fibrinogén alebo inhibícia mobilizácie vápenatých iónov. Inhibícia týchto trombocytových funkcií vedie k zabráneniu vytvorenia trombu. Tvorba trombu v krvi *in vitro* perfundovanej kolagénom bola pri vystavení tamarixetínu znížená o  $55 \pm 12\%$  (Stainer AR et al. 2019).

Bolo pozorované zvýšenie účinku (aditívny efekt) kyseliny acetylsalicylovej ako antitrombotického liečiva pri spoločnom podaní s tamarixetínom, pričom pri vyššej koncentrácii bol pozorovaný synergistický (viac než aditívny) účinok. Táto skutočnosť môže mať pozitívny vplyv na nežiaduce účinky kyseliny acetylsalicylovej (zvýšenie krvácavosti) (Stainer AR et al. 2019).

### 3.5.3 Diuretické účinky

Štúdia na rastlinnom produkte používanom v čínskej ľudovej medicíne – Xiheliu dokázala jeho diuretické účinky. Jednou z dvoch hlavných účinných látok Xiheliu bol tamarixetín a druhou kaempferid. Avšak samostatne tieto látky významný diuretický efekt nepreukázali (Xu FQ et al. 2012).

### 3.5.4 Alergia

Tamarixetín ukázal potenciál v prevencii alergických zápalových ochorení. Jeho mechanizmom účinku je, že znižuje uvoľňovanie enzýmu  $\beta$ -hexosaminidasa v BMMCs (mononukleárne bunky ľudskej kostnej drene). Ďalším mechanizmom sa ukázalo zníženie hladiny intracelulárneho vápnika v bunkách BMMCs a tiež inhibícia fosforylácie fosfolipázy C $\gamma$ 1. Tamarixetín ďalej inhiboval fosforyláciu cytosolickej fosfolipázy A2, čím spôsobil zníženie hladiny leukotrienu C4 – mediátora zapojeného v procese astmy a zápalových procesov. Inhiboval COX-2 (cyklooxygenáza 2) expresiu a produkciu prostaglandínu D2. Všetky tieto mechanizmy viedli ku inhibícii degranulácie žírnych buniek – poklesu uvoľňovania mediátorov zápalu a inhibícii tvorby eikosanoidov (Shunli P et al. 2021).

### 3.5.5 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je forma demencie s nie úplne jasnou etiológiou. V priebehu sa kvôli vytvoreniu extracelulárnych beta-amyloidových plakov a intracelulárnych neurofibrilárnych spleťí tau proteínu prerušuje neuronálna komunikácia. Kľúčovým enzýmom pri tvorbe beta-amyloidových plakov je BACE1 ( $\beta$ -sekretáza 1), ktorej inhibíciou nastáva blok tvorby týchto plakov (Das S et al. 2020).

Tamarixetín sa ukázal ako inhibítor BACE1 (potláčal tvorbu fibríl a oligomérov) a teda má antiamyloidogénny účinok (Das S et al. 2023).

### 3.5.6 Antioxidačné účinky

Oxidačný stres značí nerovnováhu medzi voľnými radikálmi a antioxidantmi. Dlhodobý oxidačný stres prispieva k rozvoju veľkého množstva ochorení, vrátane rakoviny, diabetes mellitus, kardiovaskulárnych chorôb alebo arteriosklerózy. Prirodzene hrá významnú rolu v priebehu starnutia. Prechodne je ale taktiež súčasťou primeraného zápalu, čo je normálna imunitná reakcia organizmu. Oxidačný stres môže byť podporený viacerými vonkajšími faktormi ako sú nedostatok pohybu alebo fajčenie, ale taktiež vnútornými, napríklad nesprávnou funkciou mitochondrií (Chagas MDSS et al. 2022).

Mechanizmom účinku flavonoidov pri vychytávaní voľných radikálov spočíva v reakcii hydroxylovej skupiny flavonoidu s kyslíkom voľného radikálu za vzniku nereaktívneho produktu (Panche AN et al. 2016).

Antioxidačná účinnosť flavonoidov výrazne závisí od ich štruktúry. Konkrétne na počte a pozícii hydroxylových skupín na flavanovom jadre, ktorý pozostáva z troch kruhov. Pri študovaní vzťahu štruktúry a účinku sa zistilo, že keď je hydroxylová skupina v polohe 3 voľná, zvýši sa antioxidačná aktivita. Tamarixetín má dokázanú trojnásobne vyššiu antioxidačnú aktivitu než glykosid quercetínu. Pri testovaní na líniiach rakovinových buniek B16F10 kože ukázal tamarixetín vysokú schopnosť inhibovať tvorbu melanínu a aktivitu tyrozináz, čo potvrdilo jeho antimelanogénnu aktivitu a aj nízky cytotoxický efekt (Darsandhari S et al. 2021).

Jedným z hlavných environmentálnych problémov súčasnosti je uvoľňovanie mikroplastov z procesu degradácie styrenových polymérov do životného prostredia. Mikroplasty predstavujú hrozbu pre zdravie človeka nakoľko kvôli svojej veľkosti penetrujú cez epidermis alebo sú inhalované, prijaté v potrave a vode. Po vstupe do ľudského tela majú tendenciu kumulovať sa v pečeni, kde spôsobujú poškodenie tkaniva, oxidačný stres a abnormálne biochemické a zápalové procesy. Hepatotoxicita mikroplastov bola experimentálne zmiernená tamarixetínom. U potkanov, ktorým bola hepatotoxicita indukovaná, dochádzalo po podaní tamarixetínu k redukcii zápalových markerov. Tamarixetín taktiež spôsobil up-reguláciu Bcl-2 génu, ktorý inhiboval apoptotickú cestu a bunkovú smrť. Ďalej došlo k reparácii histopatologických zmien ako degenerácia lalokov a hepatocytov, nekroza a dilatácia sinusoidov (Ijaz MU et al. 2023).

Flavonoidy majú silný antioxidačný účinok, avšak stojí za zmienku, že oxidované flavonoidy môžu reagovať s thiolovými skupinami za vzniku nefunkčných produktov,

ako bolo preukázané pri dôležitom enzýme kreatín-kináza. Pričom tamarixetín vykazoval nižšiu thiolovú toxicitu než quercetín (Lemmens KJ et al. 2014). Kreatín-kináza (CK) je thiol obsahujúci enzým, ktorý je dôležitý pre energetický metabolizmus bunky. Quercetín oxidovaný na chinón reaguje s thiolom v CK a inhibuje ho, čo môže mať pre bunku fatálne následky. Vďaka vyššej afinite tamarixetínchinónu k askorbátu pri jeho spätnej redukcii na tamarixetín je CK pred jeho oxidačným vplyvom chránená (Lemmens KJ et al. 2014).

Tamarixetín bol vo viacerých štúdiách porovnávaný s účinkami iných flavonoidov, hlavne quercetínu. U quercetínu bol zistený antioxidačný účinok, avšak pri oxidácii sa z neho vytvára produkt (chinón), ktorý nie je pre organizmus prospešný. Ako obranný mechanizmus organizmu pred oxidačnými vplyvmi teda pred reakciami chinónov s thiolovými skupinami proteínov pôsobia hlavne askorbát a GSH (glutathion). GSH je ale ako ochranná molekula rýchlo vyčerpaná a thiolové skupiny opäť vystavené oxidovanému quercetínu. Tamarixetín ako metabolit quercetínu mal dokázanú väčšiu reaktivitu s askorbátom, a teda mal zo skúmaných flavonoidov na proteíny najmenej škodlivý efekt. Tamarixetín má silnú antioxidačnú aktivitu (aj keď menšiu ako quercetín) a oxidovaný tamarixetín sa pomocou reakcie s askorbátom regeneruje na znova na tamarixetín, čo znásobí jeho antioxidačný účinok (Moalin M et al. 2012).

### 3.5.7 Antikancerogénne účinky

Antikancerogénne účinky tamarixetínu sa zistili aj na bunkách HCA-7 (ľudské bunky rakoviny hrubého čreva). Tieto bunky obsahujú značné množstvo enzýmu cyklooxygenázy, ktorý je zodpovedný za premenu kyseliny arachidónovej na tromboxany a prostaglandíny a vyskytuje sa v organizme v troch formách ako COX-1, COX-2 a COX-3. V HCA-7 bunkách sa vyskytoval takmer výlučne len COX-2, ktorého prítomnosť a aktivita bola dokázaná nameraním vysokej hladiny PGE-2 (prostaglandín E2) ako jeho produktu. Po aplikácii quercetínu sa sledovala schopnosť inhibovať produkciu PGE-2 sa zistilo, že jeho metabolit tamarixetín znižoval hladinu PGE-2 o viac než 90%, čo naznačuje silnú COX-2 inhibičnú aktivitu (Jones DJ et al. 2004).

V *in silico* aj *in vitro* štúdiách tamarixetínu bol dokázaný potenciál pre chemoterapeutický účinok v terapii karcinómu prsníka. Tamarixetín pôsobil na viaceré charakteristické znaky karcinogénneho procesu ako napríklad inhibícia proliferácie a to zastavením G2/M fáze bunkového cyklu. Ďalej inhiboval schopnosť buniek sformovať nezávislé kolónie.

Redukciou mitochondriálneho membránového potenciálu dokáže tamarixetín indukovať apoptickú kaskádu a teda má antimigračnú a antiinvazívnu aktivitu (Shaji SK et al. 2022).

Cytotoxické vlastnosti tamarixetínu boli dokázané na rôznych typoch ľudských rakovinových buniek. Mechanizmus účinku, kde dôjde k zastaveniu G2/M fáze na úkor fáze G1 a teda indukcii apoptózy spôsobil zvýšenie počtu apoptotických buniek na päťnásobok. Najviac na tamarixetín v danej štúdií reagovali lymfoidné a myeloidné leukemické bunky a Burkittov lymfóm. Tamarixetín taktiež inhibuje polymerizáciu tubulínu. Porovnávaním vzťahu štruktúry a účinku bolo dokázané, že metyláciou hydroxylových skupín quercetínu sa získajú zlúčeniny s vyššími antiproliferatívnymi vlastnosťami voči rakovinovým bunkám. Tamarixetín sa vďaka lipofilnejšej štruktúre dokáže na rozdiel od quercetínu ľahšie dostať do intracelulárneho priestoru (Nicolini F et al. 2014).

Tamarixetín má potenciál aj v terapii nádoru pečene. Jeho účinkov bolo viacero a mali rôzne mechanizmy. Jedným z nich bola indukcia apoptotických procesov napríklad pomocou aktivácie kaspáz. Taktiež zvyšuje intracelulárnu hladinu ROS (reaktívne formy kyslíka), čo spôsobuje uvoľňovanie ROS z mitochondrií do cytoplazmy, mechanizmus známy ako ROS indukovaná apoptóza. Tamarixetín tiež potláča fosforyláciu kináz endoplazmatického retikula a proteínkinázy B, ktoré majú prokancerogénny proliferatívny a antiapoptotický efekt, čím tamarixetín spúšťa apoptózu indukovanú mitochondriami (Xu J et al. 2019).

Nikotín a NNK (4-methylnitrosamino-1-3-pyridyl-1-butanon) obsiahnuté v cigaretovom dyme spôsobujú up-reguláciu signálnych ciest, ktoré sú zodpovedné za proliferáciu, inhibíciu apoptózy, vznik metastáz a angiogénezu, čím dochádza k zvýšeniu rizika vzniku NSCLC (nemalobunkového karcinómu pľúc). Tamarixetín zvyšovaním expresie génov spojených s apoptózou má inhibičný účinok na proliferáciu nádorových buniek (Alsharairi NA 2023).

Najčastejším typom karcinómu pľúc je adenokarcinóm ako NSCLC. Tamarixetín aktivovaním kaspázy-3 indukoval apoptotickú smrť buniek A549 a HCC-44. Materská zlúčenina quercetín dosahovala cytotoxické účinky v mnohokrát vyššej koncentrácii ako v tých, pri ktorých podobný účinok dosiahol tamarixetín (Sak K et al. 2018).



### 3.5.8 Antimetastatické účinky

Metastázy sú jedným z hlavných príčin vysokej mortality onkologických ochorení. Medzi proteolytické enzýmy, ktoré sú zodpovedné za remodeláciu – degradáciu - matrixu a následnú tvorbu metastáz patria MMP (matrixové metaloproteinázy) (Piperigkou Z et al. 2021).

Tamarixetín inhibične účinkuje na MMP-9 tak, že inhibuje aktivitu NF- $\kappa$ B, čo je transkripčný faktor, ktorý reguluje expresiu MMP-9. Okrem toho moduluje aj aktivitu endogénnych regulátorov MMP-9. Tieto mechanizmy majú za následok zastavenie invázie a migrácie nádorových buniek (Shaji SK et al. 2021).

### 3.5.9 Inhibičné účinky na cytochrómy P450

Tamarixetín pri podávaní spolu s liečivami znižujúcimi hladinu cholesterolu, konkrétne s fluvastatínom, ktorý je metabolizovaný cez CYP2C, sa ukázal ako silný inhibítor enzýmovej aktivity tohoto cytochrómu *in vitro*. Tamarixetín zvýšil týmto mechanizmom biodostupnosť fluvastatínu *in vivo*. Dokázaná inhibícia bola silnejšia ako u známeho inhibítora ketonazolu. Z uvedeného vyplýva, že vyšší príjem tamarixetínu v potrave môže ovplyvniť účinnosť podávaných liečiv (Wang HJ et al. 2014).

### 3.5.10 Antibakteriálne účinky

Tamarixetín môže mať taktiež potenciál pri znižovaní antibiotickej rezistencie baktérií *Staphylococcus aureus*, ktoré spôsobujú život ohrozujúce infekcie ako endokarditída, pneumónia alebo sepsa. Pri skúmaní jeho vlastností na myšom modeli s pneumóniou sa ukázal ako látka, ktorá inhibuje caseinolytickú proteázu P, ktorá je kľúčovým enzýmom pre homeostázu a teda virulenciu *S. aureus* a zároveň nemá vplyv na rast baktérie *S. aureus*. Taktiež inhiboval HLA proteín (proteín ľudského leukocytového antigénu) v *S. aureus*, čo zastavilo ním vyvolanú hemolýzu. V súčasnosti sa ako liek na meticilín-rezistentného zlatého stafylokoka používa cefotaxim, s ktorým tamarixetín vykazoval synergický účinok (Song W et al. 2022).

Bakteriálna sepsa je závažné ochorenie, ktorej príčinou je agresívna zápalová reakcia organizmu, ktorej pôvodcom je mikrobiálna infekcia. Spúšťačom tohto zápalového procesu môže byť aj endotoxémia indukovaná lipopolysacharidmi baktérií. Tamarixetín znižuje produkciu zápalových cytokínov a indukuje produkciu IL-10-

protizápalového cytokínu. Účinkuje teda ako prevencia bakteriálnej sepsy (Park HJ et al. 2018).

*Proteus mirabilis* je jednou z gramnegatívnych baktérií najčastejšie spôsobujúcich nozokomiálne infekcie močového systému spolu s enterobaktériami a *Escherichia coli*. Vďaka schopnosti *Proteus mirabilis* vytvoriť silný biofilm ako jeden z hlavných faktorov jeho virulencie, si vybudoval silnú antibiotickú rezistenciu. Rastlinná droga *Alhagi maurorum* (čel'ad' *Fabaceae*) používaná v tradičnej medicíne na strednom východe, kvôli jej antibakteriálnym účinkom, má jednu z hlavných účinných látok tamarixetín (Mirzaei A et al. 2022).

Tamarixetín je využívaný ako flavonoidový biomarker pri hodnotení príjmu ovocia a zeleniny, ovocných štiav a čaju v strave. Pre toto hodnotenie sa zberá vzorka moču za noc alebo počas 24 hodín (Krogholm KS et al. 2012).

### 3.6 Farmakokinetika tamarixetínu

#### Biodostupnosť

Pre popísanie farmakokinetiky, konkrétne biodostupnosti tamarixetínu po orálnom ale aj intravenóznom podaní prebehli viaceré štúdie. Tieto štúdie slúžia na získanie základného prehľadu o farmakokinetike tamarixetínu na ľudskom organizme a na rôznych živočíšnych druhoch. Pri sledovaní *in vivo* biodostupnosti sa použila potkania plazma, kde sa pozorovala koncentrácia tamarixetínu v čase pomocou HPLC-MS/MS (kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou) metódy. Plazmatická hladina tamarixetínu označená ako  $c_{\max}$  po orálnom podaní bola 49,72 ng/ml, pritom aplikovaná dávka bola 20 mg/kg. Plazmatická hladina tamarixetínu označená ako  $c_{\max}$  po intravenóznom podaní bola 967,93 ng/ml, pritom aplikovaná dávka bola 2 mg/kg. Biodostupnosť po orálnom podaní bola kalkulovaná na  $20.3 \pm 12.4 \%$  (Shen J et al. 2019). Odpovedajúce farmakokinetické parametre u človeka zatiaľ nie sú k dispozícii.

#### Distribúcia

Z vyššie uvedenej štúdie na potkanoch vyplýva, že tamarixetín sa pravdepodobne prednostne distribuuje do tkanív a buniek než by zostával v systémovej cirkulácii a predpokladá sa, že kvôli nízkej rozpustnosti má nízku absorpciu po orálnom podaní (Shen J et al. 2019).

V ďalšom výskume sa sledovala distribúcia metabolitov quercetínu do tkanív u potkanov. U jedincov s 0,1% quercetínovou diétou na každý deň počas 11 týždňov boli najvyššie koncentrácie tamarixetínu zaznamenané v pľúcach (2,84 nmol/g), semenníkoch (2,07 nmol/g) a obličkách (1,88 nmol/g) a najnižšie koncentrácie boli v mozgu (0,19 nmol/g), bielom tukovom tkanive a v slezine (de Boer VC et al. 2005). Odpovedajúce farmakokinetické parametre u človeka zatiaľ nie sú k dispozícii.

### **Metabolizmus**

Už okolo roku 2000 sa objavili špekulácie, že bioaktívne formy flavonoidov nemusia byť nevyhnutne tie prirodzené (glykozidy), ale môžu to byť rôzne metabolity vrátane konjugátov (Spencer JP et al. 2004). V doteraz vykonaných výskumoch sa ukázalo, že vo všetkých skúmaných živočíšnych druhoch (ľudia, potkany, prasatá) sa metylované deriváty quercetínu, teda aj tamarixetín, vyskytujú nie vo forme voľných aglykónov ale takmer výlučne vo forme sulfátových a glukurónových konjugátov. Biologická aktivita aglykónov a konjugátov môže byť odlišná (Egert S et al. 2008).

Často krát látky, ktoré prejdú metabolizmom majú znížený účinok než pôvodná zlúčenina. U flavonoidov je zrejmé, že niektoré metabolity majú vyššiu biologickú aktivitu než parentné látky. Môže sa jednať o metabolity, ktoré vznikli v tráviacom systéme, enterocytoch ale aj o pečňové metabolity. Aktivitu vykazujú aj malé fenolické metabolity vytvorené v distálnych častiach tráviaceho systému vplyvom mikrobiomu (Pourová J et al. 2018).

Flavonoidy sa metabolizujú v pečeni a enterocytoch tenkého čreva na *O*-metylované, glukuronidované alebo sulfatované produkty. Čas, ktorý strávi flavonoid v plazme využije na metabolizmus v krvných kompartmentoch, s ktorými interaguje (Wright B et al. 2010). Flavonoly predtým ako sa dostanú do obehu podliehajú konjugácii (sulfatácii, glukuronidácii a metylácii) v pečeni a črevách pomocou COMT, uridin-5'-difosfát-glukuronosyl-transferáz a fenol-sulfotransferáz (Wein S et al. 2018). Enzým rozkladajúci flavonoidy (COMT) sa nachádza v týchto štruktúrach (erytrocyty, leukocyty), čo znamená, že tu metabolizmus môže prebiehať. Metabolizmus v rôznych častiach tela sa môže líšiť. Tamarixetín ako metabolit quercetínu získava prístup do cytosolu trombocytov, taktiež je vychytávaný erytrocytmi. Existuje štúdia, ktorá dokázala ich interakciu s leukocyty. Tamarixetín bol schopný dostať sa do cytosolu trombocytov avšak jeho metabolizmus v nich neprebehol narozdiel od quercetínu. Prítomnosť

tamarixetínu v trombocytoch ale ukázala potenciál v pridaní glukuronidovej alebo sulfátovej skupiny pripojiť sa na A-C kruh v molekule (Wright B et al. 2010).

Najpreskúmanejším flavonoidom je pravdepodobne quercetín. O jeho metabolizme je známe, že prebieha vo viacerých orgánoch. Dochádza k vzniku rôznych konjugátov – glukuronidované, metylované a sulfatované. Fenolické kyseliny vznikajú ako produkty metabolizmu v tenkom a hrubom čreve (Alizadeh SR a Ebrahimzadeh MA 2022). Distribučný a eliminačný polčas sú 0,7–7,8 min a 3,8–86 min. Medzi hlavné metabolity quercetínu patria quercetin-3-*O*-sulfát, quercetin-3-glukuronid a quercetin-3-sulfát. Quercetín ako lipofilná látka má limitovanú biodostupnosť a rozpustnosť vo vode (Batiha GE et al. 2020).

Informácií o tamarixetíne je k dispozícii menej, ale je jasné, že metabolizmus tamarixetínu nie je rovnaký ako metabolizmus quercetínu pretože tamarixetín neobsahuje hydroxylovú skupinu, ktorá by sa konjugovala a tým umožňovala oxidáciu v molekule na chinón. Tamarixetín môže byť občas demetylovaný späť na quercetín, čo je spôsobené cytochrómom P450 a môže viesť k ďalšiemu metabolizmu a zároveň k odstráneniu tamarixetínu z bunky. Tamarixetín svojím metabolizmom vo fibroblastoch poskytuje ochranu bunky pred oxidatívnym stresom, avšak presný mechanizmus nie je objasnený (Spencer JP et al. 2003).

V pečňových mikrozómoch izolovaných z ľudského organizmu bol pozorovaný metabolizmus flavonoidov, ktorý prebiehal na CYP-och. Rovnakým spôsobom prebiehal metabolizmus aj na mikrozómoch izolovaných z myšej pečene, čo naznačuje univerzálnosť ciest metabolizmu týchto zlúčenín v pozorovaných druhoch. Do metabolizmu tamarixetínu sa zapája konkrétne CYP1A2 a CYP3A4. Tieto enzýmy katalyzujú hydroxylačné aj demetylačné reakcie. Z tohto hľadiska je dôležité spomenúť aj možnosť ovplyvnenia metabolizmu tamarixetínu a teda aj iných flavonoidov induktormi alebo inhibítormi CYP izoenzýmov. Taktiež metabolizmus iných zlúčenín ako substrátov CYP-ov môže byť ovplyvnený metabolizmom flavonoidov (Breinholt VM et al. 2002).

Veľkú rolu v účinnosti flavonoidov, a hlavne ich metabolitov, hrá tiež polymorfizmus, teda odlišnosti v expresii enzýmov CYP medzi jednotlivcami. Jedinci s odlišným profilom CYP-ov môžu mať odlišnosti v metabolizme v potrave prijatých flavonoidov

a teda aj v účinnosti ich metabolitov a benefitov z prijímania ich v strave (Breinholt VM et al. 2002). Podobne dôležitú rolu hrá interindividuálna variabilita v mikrobióme.

### **Eliminácia**

Polčas eliminácie tamarixetínu je po intravenóznom podaní u potkana 0,03 hodiny, čo naznačuje, že jeho koncentrácia v plazme rapídne klesla, pričom eliminácia po orálnom podaní sa ukázala ako oveľa pomalšia – 9,68 hodín. (Shen J et al. 2019). Odpovedajúce farmakokinetické parametre u človeka zatiaľ nie sú k dispozícii.

### **3.7 Plazmatické koncentrácie**

Pre dosiahnutie biologického účinku látky je kľúčová dosiahnutá koncentrácia v plazme. Aj keď sa publikované práce značne rozchádzajú v metodike, je zrejmé, že existujú medzidruhové rozdiely. Dostupné poznatky pre vybrané druhy vrátane človeka sú uvedené nižšie.

#### **Ľudia**

Pri vyhodnocovaní zloženia, absorpcie a účinnosti extraktu rakytníka rešetliakového na prevenciu kardiovaskulárnych ochorení sa po požití ovsenej kaše s extraktom vyhodnotili plazmatické koncentrácie jednotlivých flavonoidov. Pre zvýšenie absorpcie bol pridaný olej z rakytníka. Plazmatická koncentrácia tamarixetínu bola nameraná po podávaní rôznych koncentrácií extraktu v časových intervaloch. 2 hodiny po podaní jedla označeného ako 1B, ktoré pozostávalo z 78 mg flavonolov a 3 g oleja z rakytníka vo forme ovsenej kaše, sa namerala plazmatická koncentrácia 0.245  $\mu\text{mol/l}$  (Suomela JP et al. 2006).

Plazmatické koncentrácie boli namerané aj v štúdiu, kde sa skúmala biodostupnosť quercetínu po jeho podaní do ľudského organizmu v rôznych formách a namerali sa plazmatické koncentrácie jeho monometylovaných metabolitov, teda aj tamarixetínu. V štúdiu sa dokázala väčšia koncentrácia metabolitov - tamarixetínu, po konzumácii cereálnych tyčiniek obohatených o quercetín (dávka 134 mg) bola koncentrácia tamarixetínu vyššia (213,1 nmol/l) než po podaní quercetínu vo forme kapsúl v dávke 132mg (22,9 nmol/l) (Egert S et al. 2012).

Po podávaní nápojov a jedál bohatých na flavonoidy - quercetín- ako napríklad neošúpané jablká, produkty z hrozna, ovocné šťavy, citrusové ovocie, bobuľové ovocie, cibuľa, brokolica, fazuľové struky, kel, čaj a červené víno sa v ďalšej časti po vymývacom období podávala dávka quercetínu v kapsuliach (denná dávka bola 150 mg). Boli namerané plazmatické koncentrácie tamarixetínu ako metabolitu quercetínu 6,2 nmol/l (Egert S et al. 2008).

U zdravých dospelých ľudí bola 24 hodín po podaní quercetínu 1095 mg so štandardným jedlom nameraná plazmatická hodnota tamarixetínu 0,48  $\mu\text{mol/l}$  (Guo Y et al. 2014).

Pri štúdií farmakokinetiky quercetínu bola podaná denná dávka 1095mg quercetínu pri diéte bez obsahu tukov, s nízkym a vysokým obsahom tukov. Následne boli zmerané plazmatické koncentrácie tamarixetínu. Pri diéte bez tukov 0,36  $\mu\text{mol/l}$ , pri diéte s nízkym obsahom tukov 0,37  $\mu\text{mol/l}$  a s vysokým obsahom tukov 0,52  $\mu\text{mol/l}$ . Zistilo sa, že obsah tukov v diéte ovplyvňuje absorpciu quercetínu, konkrétne najvyšší obsah metabolitov bol nameraný pri diéte s vysokým obsahom tukov. Avšak podiel tukov neovplyvňuje činnosť COMT a teda zvýšené hodnoty tamarixetínu sú pravdepodobne vďaka zvýšeným hodnotám quercetínu (Guo Y et al. 2013).

Znáмым zdrojom flavonoidu quercetínu sú cibuľové šupy. Ich práškovaný extrakt sa vo forme kapsúl (v celkovej dávke 163 mg quercetínového ekvivalentu) podával pacientom, čo umožnilo získať plazmatické hodnoty metabolitov quercetínu, teda aj tamarixetínu. Pričom koncentrácia tamarixetínu v plazme bola vyššia (46,6 nmol/l) po podaní extraktu než po podaní kapsúl v celkovej dávke 150 mg plnených quercetín dihydrátom (10,6 nmol/l) (Burak C et al. 2017).

## **Hlodavce**

Tamarixetín bol detekovaný v plazme myší po intravenóznom podaní quercetínu v dávke 3 mg/kg, ktorý sa na tamarixetín metabolizoval avšak presné hodnoty jeho plazmatickej koncentrácie neboli v štúdií uvedené (Hayamizu K et al. 2018).

Prítomnosť tamarixetínu v plazme bola nameraná tiež na potkanoch avšak iba ak administrácii quercetínu predchádzala diéta zbavená flavonoidov. Po podávaní špecifickej stravy a následne experimentálneho jedla obsahujúceho 0,2 % quercetínu potkanom bol v ich plazme detekovaný tamarixetín, ktorého koncentrácia stúpala prvých

12 hodín a následne postupne klesala až po 24 hodinový interval keď sa už v plazme nenachádzal (Manach C et al. 1997).

Potkany boli na diéte, ktorá neobsahovala žiadne detekovateľné množstvo quercetínu za súčasnej suplementácie 0,1 % (800 mg na kilogram telesnej hmotnosti) a v druhej skupine 1 % quercetínová diéta počas 11 týždňov. Zistilo sa, že desaťnásobný vzrast diétnej dávky quercetínu má za následok štvornásobný vzrast v plazmatických koncentráciách quercetínu a jeho metabolitov teda aj tamarixetínu. U jedincov s 0,1 % diétou bola nameraná plazmatická koncentrácia tamarixetínu 15,7  $\mu\text{mol/l}$  a u jedincov s 1 % diétou 67,2  $\mu\text{mol/l}$  (de Boer VC et al. 2005).

### **Prasatá**

Prasatám bol orálne podaný quercetín v dávke 50 mg/kg. Po 3-4 hodinách bola zaznamenaná plazmatická koncentrácia tamarixetínu 28,4 ng/ml (Ader P et al. 2000).

### **Kravy**

Plazmatické koncentrácie tamarixetínu boli namerané aj po podaní quercetínového aglykónu a rutínu, obe látky v dávke 9 mg/kg, teľatám v druhom a dvadsiatom deviatom dni života. Hodnoty boli 77,1 nmol/l po podaní quercetínového aglykónu a 163 nmol/l u rutín trihydrátu (Maciej J et al. 2015).

## **3.8 Vaskulárna farmakológia**

Vaskulárna farmakológia je odbor, ktorý študuje akým spôsobom konkrétne liečivá pôsobia na krvné cievy a obehový systém. Pomocou neho je možné porozumieť a poskytnúť liečbu pre rozličné kardiovaskulárne ochorenia ako napríklad hypertenzia alebo arterioskleróza. Nasleduje stručné popísanie základných súčastí vaskulárnej farmakológie.

Vaskulárny endotel je rozľahlý orgán s endokrinnou funkciou. Vaskulárny endotel má okrem funkcie bariéry medzi krvou a extracelulárnym priestorom tiež funkciu zdroja dôležitých mediátorov, ktoré sú uvoľňované napríklad na pokyn sympatického nervového systému. Endoteliálne bunky sa vyskytujú po obvode celého obehového systému vrátane kapilár a srdca. Tieto bunky zabezpečujú veľa rôznych funkcií ako napríklad tvorí priestor pre tok krvi, filtráciu tekutín, napätie krvných ciev, reguláciu hemostázy,

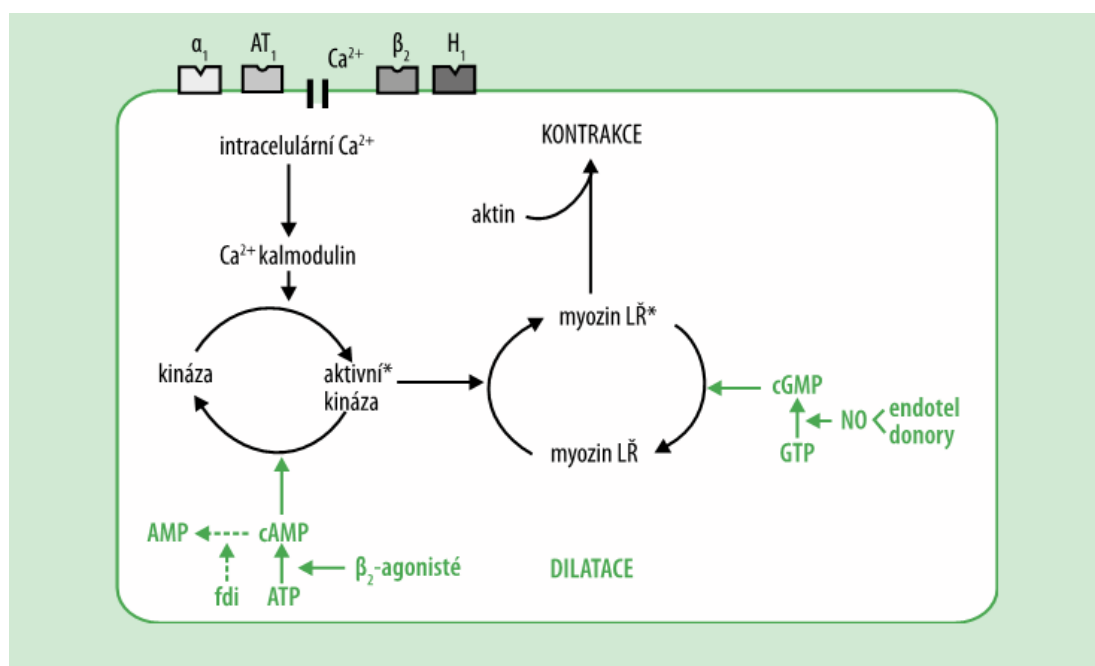
homeostázy a hormónov, väzbu neutrofilov. Endotel obsahuje vo svojej membráne naviazané veľké množstvo receptorov viažucich hormóny, metabolity, proteíny a častice, ktoré prenášajú lipidy. Taktiež sa tu nachádzajú spojovacie receptory a proteíny riadiace interakcie medzi bunkou a extracelulárnym matrixom a medzi bunkami navzájom. Trombolytickú funkciu zabezpečuje endotel pomocou rôznych mechanizmov, napríklad vytvára antitrombogénnu vrstvu udržujúcu tekutosť krvi. Naopak koagulačná funkcia je zabezpečená pomocou regulácie väzobných miest prokoagulačných faktorov ale tiež napríklad pomocou proteín C/ proteín S antikoagulačnej cesty. Endotel ďalej umožňuje interakciu trombocytov a leukocytov, čo má za následok agregáciu. Tento jav prebieha ako veľmi rýchla odpoveď počas zápalového procesu alebo zranenia cievy spúšťaná pomocou mediátorov uvoľňovaných endotelom, napríklad P-selektín. Bunky endotelu taktiež slúžia ako zdroj rastových inhibítorov a promotorov, medzi ktoré patrí napríklad heparín, sulfáty heparínu alebo doštičkový rastový faktor. Pre endotelium špecifický rastový faktor – VEGF – vaskulárny endoteliálny rastový faktor zohráva dôležitú úlohu v iniciácii vaskulogenézy, teda k formácii nezrelých ciev. Dysfunkcia endotelu, ktorej riziko sa zvyšuje vekom sa v organizme prejavuje vznikom rôznych kardiovaskulárnych ochorení (Rajendran P et al. 2013).

Bunky vaskulárneho endotelu produkujú fyziologické vazoaktívne látky, ktoré sa nazývajú relaxačné (relaxačný faktor odvodený od endotelu – EDRF) a kontraktačné faktory (EDCF), pomocou ktorých kontrolujú vaskulárny tonus. Pri poškodení cievnej steny v dôsledku arteriosklerózy alebo hypertenzie dochádza k poškodeniu endotelových buniek, proliferácii *tunica media* a migrácii buniek hladkého svalstva v *tunica intima*. Keďže endotelium je spojené s aktiváciou cGMP (cyklický guanosinmonofosfát) intracelulárneho signálneho transdukčného systému, tieto zmeny vedú aj k narušeniu jeho funkcie.

Aj keď endotel fyziologicky pôsobí predovšetkým vazodilatačne, po odstránení endotelovej vrstvy z cievnej steny sa zaznamenalo výrazné zvýšenie a tiež predĺženie trvania relaxačnej odpovede v porovnaní so situáciou kedy boli endotelové bunky prítomné. Zvýšenie relaxačnej odpovede je spôsobené tým, že nastane posilnenie vazodilatačnej odpovede mechanizmom, ktorý prebieha nezávisle na endotelii, napríklad vazodilatácia vyvolaná perivaskulárnou nervovou stimuláciou a nitroprusidom sodným (Iwatani Y et al. 2007), (Iwatani Y et al. 2008).



Konstrikciu a dilatáciu ciev na úrovni celého cievneho systému (artérie aj vény) zabezpečuje svojimi kontrakciami a relaxáciami hladký sval, nachádzajúci sa v stene ciev. Z farmakologického hľadiska tento myotropný účinok hladkého svalstva zabezpečuje kontraktálny aparát (vid' Obr. 2). Rôzne endogénne či exogénne látky, ako napríklad rastové faktory, cirkulujúce hormóny, neurotransmitéry alebo tiež niektoré liečivá, majú funkciu inhibovať či potencovať vazokonstrikčné alebo vazodilatačné mechanizmy (Martínková J et al. 2018).



**Obr. 2: Schéma kontraktívneho aparátu**

Zjednodušená schéma kontrakcie vaskulárneho hladkého svalstva (na obrázku nie je znázornený vstup extracelulárneho  $Ca^{2+}$  ani  $\beta_2$  receptory, ktoré sú umiestnené na bunkovej membráne). Vysvetlenie skratiek použitých v obrázku:  $\alpha_1$ ,  $AT_1$ ,  $\beta_2$ ,  $H_1$  - membránové receptory na hladkom svale, LŘ – ľahký reťazec, AMP - adenosinmonofosfát, cAMP – cyklický adenosinmonofosfát, ATP- adenosintrifosfát, cGMP- cyklický guanosinmonofosfát, GTP- guanosintrifosfát, fdi – fosfodiesteráza, NO – oxid dusnatý.

Prevzaté z: Martínková J et al. 2018.

Dva hlavné mechanizmy, ktoré zabezpečujú odpovedajúci vaskulárny tonus sú renín angiotenzín aldosterónový systém a vaskulárny endotel (Ritter JM et al. 2020).

## Mediátory:

- prostanoidy - prostacyklín PGI<sub>2</sub> spôsobuje relaxáciu hladkého svalu cez prostaglandínové receptory. Taktiež inhibuje agregáciu doštičiek. PGE<sub>2</sub> pôsobí ako priamy vazodilatátor. PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub> pôsobia opačne cez tromboxanové a prostanooidové receptory (Ritter JM et al. 2020).
- NO (oxid dusnatý) - je syntetizovaný z L-arginínu a molekulárneho kyslíka pomocou endotelialnej NO syntázy (e-NOS). Postupne sa uvoľňuje z endotelu odporových ciev ako fyziologická kontrola arteriálneho tlaku. Jeho ďalšími funkciami sú napríklad inhibícia adhézie trombocytov a tiež ich agregácie ako ochrana ciev pred trombózou, inhibícia proliferácie buniek hladkého svalu a funkcie monocytov a ako ochrana pred arteriosklerózou (Ritter JM et al. 2020). Avšak NO pôsobí hlavne vo veľkých cievach. V princípe NO patrí medzi gasotransmitery, podobne ako CO (oxid uhoľnatý) a H<sub>2</sub>S (sulfán). Z historických dôvodov je ale radený samostatne.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peroxid vodíka je mediátor produkovaný v bunkách hladkého cievneho svalu. Pôsobí cez aktiváciu K<sub>Ca</sub> kanálov (draslíkové kanály aktivované vápnikom), aktiváciu NO, cyklooxygenázy a cGMP (Wheal AJ et al. 2012). Má oxidačné vlastnosti a pri nedostatočnej funkcii antioxidantných systémov môže jeho nahromadenie viesť k patologickým procesom ako je kalcifikácia (Matoba T et al. 2000).
- peptidy – C-natriuretický peptid, ktorý svoj vazodilatačný efekt zabezpečuje pomocou cGMP a cAMP (cyklický adenosinmonofosfát). Ďalším peptidom je angiotenzín 2 tvorený enzýmom ACE (angiotenzín konvertujúci enzým). Endotelín 1 je ďalším peptidom, jeho syntézu stimulujú okrem iného aj zápal, trauma a aktivácia doštičiek. Tieto dva peptidy pôsobia vazokonstrikčne (Ritter JM et al. 2020).
  - ET1 (endotelín 1) pôsobí na receptor ET<sub>A</sub>, ktorý je zodpovedný za vazokonstrikciu a nachádza sa v hladkom svale ciev, nie v endotele. Druhý hlavný receptor, na ktorý pôsobí ET1 je ET<sub>B</sub>, ktorý je vysoko zastúpený v endotele ciev a jeho účinok je vazodilatačný mechanizmom zvýšenia produkcie NO a PGI<sub>2</sub> a tiež účinok inhibičný na agregáciu doštičiek. ET<sub>B</sub> receptor sa ale rovnako ako ET<sub>A</sub> nachádza aj v hladkom cievnom svale, kde spôsobuje vazokonstrikciu. Blokádou endotelínových receptorov ET<sub>A</sub>

a ETb sa lieči pľúcna hypertenzia. Úlohou endoteliálnych buniek je okrem produkovania mediátorov exprimovanie aj niektorých enzýmov, ktoré sú dôležité pri regulovaní krvného tlaku ako napríklad ACE enzým (Ritter JM et al. 2020).

### **Vazoaktívne látky**

Vazodilatačné látky sa rozdeľujú podľa mechanizmu, ktorým pôsobia na: látky pôsobiace cez iónové (pre liečivá – vápnikové) kanály, ktoré závisia od membránového napätia a zároveň ho ovplyvňujú, látky zvyšujúce množstvo cAMP alebo cGMP a látky znižujúce aktivitu vazokonstriktorov. Relaxácia hladkého cievneho svalu vedie k dilatácii žíl, ktoré sú zodpovedné za periférnu rezistenciu v krvnom riečisku, čo vedie k zníženiu predtlačenia – venózneho návratu srdca. Dilatácia artérií zase spôsobuje zníženie dotlačenia (Ritter JM et al. 2020).

Vo všeobecnosti väčšina látok pôsobí buď zvyšovaním alebo znižovaním hladiny vápnika (Ritter JM et al. 2020). Zvýšením citlivosti eNOS na účinky komplexu kalmodulínu s  $Ca^{2+}$  sa zvýši produkcia NO, tento mechanizmus je ale menej častý (Fleming I et al. 1997).

### **Blokátory vápnikových kanálov**

Hlavným iónom kontraktilného aparátu je teda  $Ca^{2+}$ . Zvýšenie intracelulárnej koncentrácie spúšťa nasledujúci mechanizmus:  $Ca^{2+}$  v spojení s kalmodulínom ako komplex aktivuje MLCK (kinázu ľahkého reťazcu myozínu), ktorá fosforyluje ľahký reťazec myozínu. Následná interakcia medzi aktínom a myozínom vedie ku kontrakcii hladkého svalstva. Popísaným mechanizmom účinkujú napríklad antihypertenzívne liečivá blokátory vápnikových kanálov, ktoré blokujú vstup vápnika do bunky cez L typ vápnikových kanálov a tým spôsobujú dilatáciu arteriálneho riečiska (Ritter JM et al. 2020).

### **Draslíkové kanály**

Sú dôležité pri regulácii membránového potenciálu, ktorý zase reguluje otváranie napätovo závislých kanálov, hlavne vápnikových a tak influx vápnika (kontrakciu svalu ciev). Regulácia proliferácie buniek cievneho svalu je ďalšou úlohou draslíkových kanálov. V bunkách je exprimovaných viacero druhov draslíkových kanálov:  $K_{Ca}$  (kanály

aktivované vápnikom) vysoko, stredne a málo vodivostné,  $K_v$  (draslíkové kanály aktivované membránovým napätím), ATP (adenosintrifosfát) senzitivne draslíkové kanály a  $K_{ir}$  (vstupne rektifikované draslíkové kanály). Látky blokujúce alebo aktivujúce tieto kanály sú dôležité v základnom výskume. Aktivita týchto kanálov môže byť regulovaná aj nepriamo rôznymi mechanizmami, obzvlášť signálnymi dráhami sprostredkovanými cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) a cGMP (cyklický guanosinmonofosfát) (Jackson WF 2017).

### **Draslíkové kanály aktivované vápnikom**

Zúčastňujú sa negatívnej spätne-väzbovej regulácie svalového napätia. Tento typ kanálov je aktivovaný vzostupom intracelulárnej hladiny vápnika teda tiež pri kontrakcii hladkého svalu. Zdrojom vápnika pre tieto receptory môžu byť nielen vápníkové kanály na plazmatickej membráne, ale aj kanály spojené s ryanodínovými receptormi alebo IP3R (inositol-trifosfátový receptor) receptormi na sarkoplazmatickom retikule (Jackson WF 2017).

### **Draslíkové kanály aktivované membránovým napätím**

Majú viac poddruhov, v cievnom systéme má dôležitú úlohu podtyp  $K_v7$ . Po aktivácii membránovou depolarizáciou sa zúčastňujú na regulácii negatívnou spätnou väzbou kontrakcie svalu. Vazodilatačné látky ich nepriamo aktivujú cez cAMP-PKA alebo cez cGMP-PKG cestu. Vazokonstrikčné látky ich naopak inhibujú cez PKC (proteínkináza C) alebo kinázu ROCK (Rho-asociovaná proteín kináza) (Ritter JM et al. 2020).

### **Draslíkové kanály aktivované adenosintrifosfátom**

Ďalším typom iónových kanálov cez ktoré môže byť sprostredkovaná vazodilatácia sú  $K_{ATP}$  (draslíkové kanály aktivované ATP). Zvýšené množstvo ATP inhibuje tieto kanály. Ich blokáda vedie k depolarizácii, následnému otvoreniu napätovo riadených  $Ca^{2+}$  kanálov a k vazokonstrikcii. Kanály  $K_{ATP}$  sú naopak aktívne a vedú ióny  $K^+$  do vnútra bunky pri kľudovom potenciáli, ale tiež pri acidóze a hypoxii. Látky, ktoré aktivujú ATP závislé draslíkové kanály, hyperpolarizujú týmto spôsobom bunkovú membránu, čo dočasne deaktivuje napätovo závislé  $Ca^{2+}$  kanály (Ritter JM et al. 2020). Tieto liečivá sú používané predovšetkým v kardiológii.  $K_{ATP}$  kanály sú blokované

derivátmi sulfonylmočoviny, ktoré sa používajú ako klasické perorálne antidiabetiká. V súvislosti s vaskulárnym systémom je zaujímavé, že u diabetikov 2. typu, ktorí boli liečení glibenclamidom, bola zistená zvýšená citlivosť na účinky angiotenzínu (Williams S et al. 1998).

## **Cyklické nukleotidy**

### **Cyklický adenosinmonofosfát**

Jedným z mechanizmov relaxácie hladkého svalstva v cievnej stene je prostredníctvom cyklického adenosinmonofosfátu. Stimuláciou membránového receptora spojeného s Gs proteínom (napríklad receptory beta-2, serotonínový 7, pre prostaglandín E<sub>2</sub>, prostacyklínový) dochádza k aktivácii adenylátcyklázy a následnej tvorbe cAMP z ATP. Pôsobením cAMP sa aktivuje proteínkináza A, ktorá je zodpovedná za inhibíciu (deaktiváciu) fosforylácie ľahkého reťazca myozínu a zároveň vedie k zníženiu hladiny vápenatých iónov v bunke (Ritter JM et al. 2020).

Nasledujúce zníženie Ca<sup>2+</sup> koncentrácie v intracelulárnom priestore je zabezpečované pomocou niekoľkých ATPáz. Presun do sarkoplazmatického retikula zaisťuje ATPáza SERCA. V plazmatickej membráne pôsobia ATPáza PMCA a Na<sup>+</sup>- Ca<sup>2+</sup> výmenníky (antiportéry), ktoré odstraňujú vápnik von z bunky (Ramanlal R a Gupta V 2023).

### **Cyklický guanosinmonofosfát**

Inhibíciu fosforylácie ľahkého reťazca myozínu a následnú relaxáciu svalstva ciev vyvoláva aj cGMP, ktorá vzniká nasledujúcim mechanizmom. NO je produkovaný hlavne keď sa hladina vápenatých iónov v endoteliálnych bunkách zvýši. eNOS katalyzuje syntézu NO v endotele cievnej výstelky, ktorý ako veľmi malá molekula voľne prechádza membránami buniek a preniká do susednej bunky hladkého cievneho svalu. Oxid dusnatý aktivuje enzým solubilnú guanylátcyklázu (sGC), ktorá katalyzuje premenu guanosintrifosfát na druhého posla cGMP. Okrem NO takto pôsobia aj nitráty (pôsobením glutationu sa premieňajú na nitrosothiol kľúčový pre tvorbu NO), ktoré sa používajú ako dilatátory koronárnych artérií pri angíne pectoris (Ritter JM et al. 2020). Enzým sGC je aktivovaný tiež liečivom riociguat, používaným v liečbe pľúcnej hypertenzie (Lang IM et al. 2021). Podobný mechanizmus účinku má natriuretický peptid C (CNP), ktorý podobne ako NO vzniká v endotele. CNP aktivuje membránovú guanylátcyklázu pGC

opäť za vzniku cGMP. Úlohou cGMP je aktivovať proteínkinázu G, ktorá v tomto procese pôsobí veľmi podobne ako proteínkináza A mechanizmom už vyššie opísaným (Pandey KN 2019).

### **Fosfodiesteráza**

Ďalším vnútrobunkovým cieľom, ktorý ovplyvňuje cyklické nuklotidy, sú izoenzy my fosfodiesterázy. Vazodilatátory pôsobia ako inhibítory PDE (fosfodiesteráza) a spomaľujú rozklad druhých poslov cAMP a cGMP. Vo vaskulárnej farmakológii sa používajú inhibítory PDE3 cilostazol (liečba ischemickej choroby dolných končatín) a milrinon (liečba akútneho srdcového zlyhania) (Cone J et al. 1999). Na rovnakom princípe účinkujú selektívne PDE 5 inhibítory ako napríklad sildenafil (liečba erektilnej dysfunkcie).

### **Ďalšie vnútrobunkové ciele**

Vaskulárny systém môže byť ďalej ovplyvňovaný inhibíciou proteínkinázy C. V klinickej praxi sa používa ruboxistaurin v terapii diabetických mikrovaskulárnych komplikácií (Casellini CM et al. 2007). Ako inhibítor ROCK kinázy sa používa v terapii pľúcnej hypertenzie liečivo fasudil (Abedi F et al. 2023). Vaskulárny systém je v princípe ovplyvnený aj dantrolenom, ktorý znižuje výdaj  $Ca^{2+}$  zo sarkoplazmatického retikula (liečba malígnej hypertermie). Dantrolen nemá významný vplyv na krvný tlak ale môže spôsobiť nárast cievnej rezistencie (Lynch C 3rd et al. 1986).

Ďalšie príklady liečiv sa radia do skupiny nepriamo pôsobiacich vazodilatancií, patria sem liečivá, ktoré inhibujú vazokonstrikciu – RAAS (renín-angiotenzín-aldosterónový systém) alebo sympatický nervový systém (antagonisti adrenoreceptoru alfa1). Ďalšou skupinou sú látky, ktoré blokujú endotelínový systém napríklad endotelínovú syntézu alebo antagonisti jeho receptorov (Ritter JM et al. 2020). Aj tieto látky v konečnom dôsledku ovplyvňujú vaskulárne vnútrobunkové mechanizmy – receptory AT1 (receptor 1 pre angiotenzín II) sa spájajú s Gq a G12/13 proteínmi, receptory alfa1 s Gq proteínom. Podobne ETa (endotelínové receptory A) receptory sa spájajú s Gq a G12/13 proteínmi, a ETb (endotelínové receptory B) receptory s Gq a Gi. Medzi liečivá pôsobiace cez RAAS patria: inhibítor renínu (aliskiren), inhibítory angiotenzín konvertujúceho enzýmu (perindopril), antagonisti receptoru AT1 pre angiotenzín II (losartan). Používajú sa v terapii arteriálnej hypertenzie.

Do skupiny liečiv, ktoré pôsobia na dráhe endotelínu 1 sa zaraďujú blokátory endotelínovej syntézy – fosforamidon (obsolentné liečivo) a antagonisti endotelínových receptorov – ambrisentan (liečba pľúcnej hypertenzie) (Ritter JM et al. 2020).

Zníženie aktivity vazokonstrikčných faktorov je ďalším dostupným mechanizmom vazodilatácie (Martínková J et al.2018).

Klinické využitie vazokonstrikčných liečiv nie je až také časté ako u vazodilatancií. Agonisti receptorov alfa1 sa využívajú v lokálnej aplikácii, kedy spôsobujú nazálnu dekonngesciu (oxymetazolín), ďalej v ko-administrácii s lokálnymi anestetikami (noradrenalín). Agonisti V1 receptoru pre vazopresín sa používajú napríklad na zastavenie krvácania z esofageálnych varixov pri portálnej hypertenzii alebo na zastavenie krvácania v urogenitálnom trakte (terlipresin). Triptany (sumatriptan) pôsobia ako agonisti na 5-hydroxytryptamínových receptoroch 5-HT1B/1D, používajú sa v terapii migrény (Ritter JM et al. 2020). V terapii hereditárneho angioedému sa zvýšené uvoľňovanie bradykinínu, ktoré vedie k úniku plazmy inhibuje liečivom ikatibant, ktorý pôsobí ako antagonista endoteliálnych B2 receptorov pre bradykinín (B2 sú membránové receptory spojené s Gq a Gi proteínmi). Tento mechanizmus vedie k vazokonstrikcii (Barratt-Due A et al. 2011).

Vazoaktívne látky sú okrem klinickej praxe dôležité v základnom výskume. Niektoré z nich boli použité v tejto diplomovej práci. Ich prehľad je uvedený v Tab. 1.

<b>látka</b>	<b>cieľová štruktúra</b>	<b>účinnok</b>
Forskolin	proteínkináza A	vazodilatačný
Nitroprusid sodný	proteínkináza G	vazodilatačný
ODQ	sGC	vazokonstrikčný
Iberiotoxin	BK <sub>Ca</sub> kanály	vazokonstrikčný
4-aminopyridin	K <sub>V</sub> kanály	vazokonstrikčný
Linopirdin	K <sub>V7</sub> kanály	vazokonstrikčný
BaCl <sub>2</sub>	K <sub>ir</sub> kanály	vazokonstrikčný
Glibenklamid	K <sub>ATP</sub> kanály	vazokonstrikčný
DT-3	proteínkináza G	vazokonstrikčný
Rp8-pCPT-cGMPs	proteínkináza G	vazokonstrikčný
BayK-8644	L-typ vápnikových kanálov	vazokonstrikčný

**Tab. 1: Vazoaktívne látky použité v diplomovej práci**

*sGC* - solubilná guanylátcykláza

*DT-3* - špecifický inhibitor PKG 1Alfa

*ODQ* - 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on



## 4 CIEĽ A ZADANIE PRÁCE

Cieľom experimentálnej časti tejto diplomovej práce bolo uskutočniť úvodný screening vazodilatačného účinku na desiatich vybraných látkach z rastliny hloh na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie. Následne vybrať najúčinnjšiu látku z pozorovaných a vykonať na nej štúdium mechanizmu účinku.

## 5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 5.1 Biologický materiál

Experimenty boli vykonané na koronárnych artériách, ktoré boli odobrané z prasacích sŕdc. Srdcia boli získané z bitúnku Letohrad a spracované približne do 4 hodín od usmrtenia zvierat, 9 zdravých ošípaných oboch pohlaví, ktoré pochádzali zo štandardného chovu zabezpečeného veterinárnou kontrolou a boli určené na konzumáciu.

### 5.2 Použité vybavenie

#### 5.2.1 Chemikálie

Chemikálie použité pri experimentoch boli: Krebsov živný roztok, vazoaktívne látky (viď Tab.2), rozpúšťadlá (viď Tab. 5) a 10 skúšaných polyfenolických látok.

Látka	Vzorec	MW	Rozpúšťadlo
BayK-8644	$C_{16}H_{15}F_3N_2O_4$	356,3	DMSO
DT-3	$C_4H_9O_5S_2$	201,24	DMSO
Forskolin	$C_{22}H_{34}O_7$	410,5	DMSO
Glibenklamid	$C_{23}H_{27}ClN_3O_5S.K$	532,1	DMSO
Linopirdin	$C_{26}H_{21}N_3O$	391,5	DMSO
ODQ	$C_9H_5N_3O_2$	187,2	DMSO
Rp8-pCPT-cGMPS	$C_{16}H_{14}ClN_5O_6PS_2.Na$	525,9	DMSO
Chlorid bárnatý	$BaCl_2$	208,23	Krebsov roztok
Nitroprusid sodný	$C_5H_4FeN_6Na_2O_3$	297,95	Krebsov roztok
4-aminopyridin	$C_5H_6N_2$	94,1	miliQ voda
Iberiotoxin	$C_{179}H_{274}N_{50}O_{55}S_7$	4230,9	miliQ voda

**Tab. 2: Vazoaktívne látky**

*Vysvetlenie skratiek: ODQ - 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]chinoxalin-1-on*

*DT-3 - špecifický inhibítor PKG 1Alfa*

Látka	MW	Vzorec
Isovitexin	432,4	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>
Hyperosid	464,4	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>
Quercetin	302,23	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>
Kyselina chlorogenová	354,31	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>
Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (3,4-DHPA)	198.13	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>
Kyselina 3,4- dihydroxyhydroskořicová (3,4-DHHCA)	182,17	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>
Kyselina hippurová	179.17	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
Kyselina 3-kumarová	164.16	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>
Kyselina olenalová	456.7	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>
Tamarixetín	316.26	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>

**Tab. 3: Desať polyfenolických látok z hlohu testovaných v úvodnom screeningu**

*MW- molekulárna hmotnosť*

### **Krebsov živný roztok**

Pre vytvorenie podmienok veľmi podobných vnútornému prostrediu organizmu bol ako živné médium pre svoje vlastnosti použitý izotonický Krebsov roztok s pH 7,4. Na jeho prípravu je potrebné rozpustiť v malom množstve destilovanej vody všetky látky z Tab. 4 okrem chloridu vápenatého, ktorý sa navažuje a rozpúšťa zvlášť, aby sa predišlo vyzrážaniu slabo rozpustných vápenatých solí. Nakoniec sa obidva roztoky zmiešajú a doplnia destilovanou vodou na požadovaný objem.

Látka	Vzorec	Koncentrácia g/l	MW(g/mol)
Chlorid sodný p.a.	NaCl	5,54	58,44
Chlorid draselný p.a.	KCl	0,35	74,56
Chlorid vápenatý p.a.	CaCl <sub>2</sub>	0,28	110,98
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	NaHCO <sub>3</sub>	2,1	84,01
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16	136,09
Síran horečnatý heptahydrát p.a.	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,29	246,48
D-glukóza monohydrát p.a.	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> .H <sub>2</sub> O	2,1	180,16

**Tab. 4: Zloženie Krebsovho roztoku**

Látka	Vzorec	MW
Destilovaná voda	H <sub>2</sub> O	18,02
MiliQ voda	H <sub>2</sub> O	18,02
Dimetylsulfoxid (DMSO)	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	78,13

**Tab. 5: Použité rozpúšťadlá**

### 5.2.2 Pomôcky a prístroje

Aparatúra pre izolované tkanivo *ex vivo* (Multi chamber tissue bath system)  
dodávateľ Experimentia Ltb., Budapešť, Maďarsko

Termostat U1 (Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH, Drážďany, Nemecko)

Force/Displacement transducer (Experimentia Ltb., Budapešť, Maďarsko)

Plynová nádoba plnená pneumoxidom (zmes O<sub>2</sub> z 95% a CO<sub>2</sub> z 5%) dodávateľ  
Linde gas, Česká republika

Počítač s vyhodnocovacím softvérom S.P.E.L., Advanced Kymograph Software  
SOFT-03- KYMO dodávateľ Experimentia Ltb., Budapešť, Maďarsko

Vyhodnocovacie programy GraphPad Prism 9 a Microsoft Excel

Automatické pipety Eppendorf

Analytické váhy Explorer Analytical

Laboratórne váhy (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Nemecko)

Trepačka IKA Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Nemecko)

Mikroskúmavky Eppendorf

Laboratórne sklo (Petriho misky, kadičky, sklenené tyčinky, lyžičky, odmerné valce

Operačné nástroje (pinzety, peany, nožnice)

Ďalšie laboratórne pomôcky (buničitá vata, špičky, gumové rukavice, chirurgická niť)

## **5.3 Metodika**

### **5.3.1 Priebeh experimentu**

#### **Príprava biologického materiálu**

Srdcia prijaté z bitúniku boli ponorené do Krebsovho roztoku. Následne bola vyoperovaná ľavá koronárna artéria a vložená do Krebsovho roztoku. Artéria bola očistená od spojivového tkaniva, krvi a pripojeného tuku. Vyčistená artéria bola narezaná na cylindrické kruhy dlhé približne 3 mm. Pri niektorých experimentoch bola vrstva endotelu mechanicky rozrušená jemným trením pinzetou po povrchu luminálnej výstelky. Kruhy boli udržiavané v tkanivových kúpeľoch z Krebsovho roztoku. Kúpele boli nahrievané na teplotu tela 37°C a zároveň boli okysličované pneumoxidom. Arteriálny kruh bol zavesený medzi dva háčiky z drôtu z nehrdzavejúcej ocele. Jeden z háčikov bol pripevnený k pevnému držiaku a druhý napojený chirurgickou niťou na prevodník, ktorý zachytával mechanickú energiu a premieňal ju na elektrický signál ktorý bol vyhodnocovaný počítačom vybaveným programom S.P.E.L. Advanced Kymograph Software, v3.2 (Experimentia Ltd., Budapešť, Maďarsko). Týmto spôsobom bolo umožnené meranie izometrického napätia.

### **Stabilizácia tkaniva**

Stabilizácia tkaniva prebiehala pred každým experimentom. Pomocou regulačných šróbov sa pridávalo napätie na tkanivových krúžkoch každých 30 sekúnd o približne 0,2 g až po konečnú hodnotu 2 g. Každých 10 minút sa vymieňalo prostredie Krebsovho roztoku v kúpeľoch. Toto obmieňanie prebehlo 4 krát.

### **Overenie funkčnosti endotelu**

Následne sa napätie tkaniva znížilo na 1g a každá nádoba sa naplnila presne 5ml Krebsovho roztoku. Do nádob bol pridaný KCl pričom finálna koncentrácia bola 40 mmol.l<sup>-1</sup>. Došlo ku kontrakcii, čím sa overila kontraktilita cievy. Po dosiahnutí stabilného stavu fázy plateau sa pridal bradykinín a jeho koncentrácia v nádobách dosiahla 300 nmol.l<sup>-1</sup>. Došlo k dilatácii, čím sa overila neporušenosť a funkčnosť endotelu (v niektorých pokusoch naopak jeho dysfunkčnosť). V nádobách bol následne niekoľkokrát vymenený Krebsov roztok kvôli premytiu arteriálnych kruhov od pridaných látok. Napätie sa ustálilo na 1g a doplnil sa objem čistého Krebsovho roztoku na 5ml.

### **Vlastný experiment – screening vazodilatačných látok**

Pred každým experimentom sa vykonali vyššie opísané kroky teda stabilizácia a overenie kontraktility tkaniva a prítomnosti/neprítomnosti funkčného endotelu. Vlastný experiment bol zahájený kontrakciou tkaniva pridaním KCl vo finálnej koncentrácii 40 mmol.l<sup>-1</sup>. Po navodení kontrakcie a po ustálení odpovede bola pridávaná testovaná látka zo screeningu (vid' Tab. 3) kumulatívnym spôsobom vo vzrastajúcich dávkach od 100 nmol.l<sup>-1</sup> do 100 μmol.l<sup>-1</sup>. Jednotlivé testované látky boli pridávané do samostatných nádob po predošlom ustálení dilatačnej odpovede. Dve nádoby z ôsmich vždy slúžili ako kontrola, kde sa pridávalo samotné rozpúšťadlo DMSO v Krebsovom roztoku taktiež v kumulatívnych koncentráciách rovnakých ako testované látky. Po pridaní všetkých testovaných koncentrácií a po ustálení odpovede bol na záver do všetkých nádob pridaný NTS (nitroprusid sodný) vo finálnej koncentrácii 100 μmol.l<sup>-1</sup>, ktorý navodil maximálnu relaxáciu arteriálnych kruhov.

### **Vlastný experiment – testovanie mechanizmov účinku**

Zo screeningu sa vyhodnotila látka s najväčším vazodilatačným pôsobením - tamarixetín a na tej prebiehalo ďalej testovanie mechanizmu účinku.

Pred každým vlastným experimentom prebehla príprava a stabilizácia tkaniva ako pri screeningu. Následne sa overila neprítomnosť endotelu, ktorý bol vo väčšine mechanistických pokusov pri príprave odstránený.

### **Testované mechanizmy**

#### Testovanie závislosti vazodilatačného účinku tamarixetínu na prítomnosti endotelu

Príprava tkaniva spočívala v odstránení endotelovej vrstvy z vnútorného lúmenu určitého počtu arteriálnych kruhov pomocou pinzety. Nasledujúce kroky prebiehali podľa vyššie uvedeného postupu. Do nádob sa pridal KCl vo finálnej koncentrácii  $40 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Po ustálení kontrakcie sa postupne pridávala testovaná látka – tamarixetín v kumulatívnych koncentráciách od najnižšej  $100 \text{ nmol.l}^{-1}$  po najvyššiu  $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Nakoniec, po ustálení bol pridaný nitroprusid sodný vo finálnej koncentrácii  $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  pre dosiahnutie maximálnej relaxácie.

#### Testovanie vplyvu tamarixetínu na relaxáciu navodenú pomocou nitroprusidu sodného alebo pomocou foskolínu

Po príprave arteriálnych kruhov bez endotelu prebiehal experiment podľa uvedeného postupu (stabilizácia tkaniva a overenie neprítomnosti endotelu). Po ustálení kontrakcie navodenej pomocou KCl vo finálnej koncentrácii  $40 \text{ mmol.l}^{-1}$  bol pridaný tamarixetín v odpovedajúcej koncentrácii  $\text{EC}_{20}$ , pričom kontrolou bolo samotné DMSO v Krebsovom roztoku v rovnakej koncentrácii ako tamarixetín. Po stabilizácii odpovede bol v kumulatívnych dávkach pridávaný NTS alebo forskolín vo vzrastajúcich koncentráciách: NTS od  $100 \text{ pmol.l}^{-1}$  do  $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  a forskolín od  $100 \text{ pmol.l}^{-1}$  do  $1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  až do dosiahnutia stavu maximálnej relaxácie.

#### Testovanie vplyvu tamarixetínu na aktiváciu solubilnej guanylátcyklázy

Po odstránení endotelu z arteriálnych kruhov, ich stabilizácii a kontrole neprítomnosti endotelu bol do nádoby pridaný ODQ vo finálnej koncentrácii  $1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Nasledovala inkubačná doba 30 minút. Po jej uplynutí nastala kontrakcia vplyvom pridaného KCl vo finálnej koncentrácii  $40 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Do nádob bol po ustálení odpovede pridaný tamarixetín vo vzrastajúcich koncentráciách kumulatívnou cestou od  $100 \text{ nmol.l}^{-1}$  do  $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Ako kontrola bol použitý DMSO (najvyššia finálna koncentrácia 0,01%) bez ODQ. Nakoniec bol pridaný NTS vo finálnej koncentrácii  $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  pre dosiahnutie 100% relaxácie kruhu.

### Testovanie vplyvu tamarixetínu na aktiváciu proteínkinázy G

Na tento typ experimentu boli opäť potrebné arteriálne kruhy s odstráneným endotelom. Po ich stabilizácii a overení neprítomnosti endotelu bol do nádob pridaný DT-3 (finálna koncentrácia  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ) alebo Rp-8-pCPT-cGMPs (finálna koncentrácia  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ). Látky boli ponechané inkubovať 30 minút. Kontrolou bolo v tomto prípade čisté vehikulum (DMSO v miliQ vode). Následne bola navodená kontrakcia pridaním KCl vo finálnej koncentrácii  $40 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Po ustálení odpovede kruhu bol jednorazovo pridaný tamarixetín v koncentrácii odpovedajúcej  $\text{EC}_{80}$   $70 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Nakoniec bol po ustálení pridaný NTS vo finálnej koncentrácii  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  pre dosiahnutie maximálnej relaxácie.

### Testovanie vplyvu tamarixetínu na $K_{\text{Ca}}$ , $K_{\text{ir}}$ , $K_{\text{ATP}}$ , $K_{\text{V}}$ kanály v hladkom cievnom svalu a na $K_{\text{V7}}$ , ktorý je typický pre cievy

U kruhov s odstráneným endotelom sa vykonala stabilizácia a overenie absencie endotelu. Po pridaní 5ml Krebsovho roztoku a nastavení napätia na 1g sa pridal iberiotoxín v koncentrácii  $20 \text{ nmol.l}^{-1}$  (vplyv na  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  kanály) alebo 4-aminopyridín v koncentrácii  $3 \text{ mmol.l}^{-1}$  (vplyv na  $K_{\text{V}}$  kanály) alebo linopirdín v koncentrácii  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (vplyv na  $K_{\text{V7}}$  kanály) alebo  $\text{BaCl}_2$  v koncentrácii  $50 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (vplyv na  $K_{\text{ir}}$  kanály) alebo glibenklamid v koncentrácii  $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$  (vplyv na  $K_{\text{ATP}}$  kanály), a nastala 30 minútová inkubačná doba. Ako kontrola sa použila miliQ voda okrem linopirdínu a glibenklamidu, kedy sa používa DMSO 0,1%. Po inkubácii sa ako konstriktčná látka pridal KCl vo finálnej koncentrácii  $40 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Keď sa ustálila odpoveď cievy, začal sa kumulatívne vo vzrastajúcich koncentráciách pridávať tamarixetín od  $100 \text{ nmol.l}^{-1}$  do  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Po ustálení relaxácie sa pre maximálnu relaxáciu pridal NTS v koncentrácii  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

### Testovanie vplyvu tamarixetínu na L-typ vápnikových kanálov

Boli pripravené arteriálne kruhy bez endotelovej vrstvy. Po ich stabilizácii a overení absencii endotelu nasledovalo premytie Krebsovým roztokom aspoň 3 krát, naplnenie nádob 5ml Krebsovho roztoku a nastavenie napätia na hodnotu 1 g. Ďalším krokom bolo pridanie KCl do finálnej koncentracie  $15 \text{ mmol.l}^{-1}$  kvôli posilneniu kontrakčnej odpovede. Nasledovalo pridanie tamarixetínu, použili sa dve koncentrácie zo screeningu – 80% a 20% a 30 minút inkubačnej doby. Ako negatívna kontrola sa pridával DMSO 0,3%. Ako pozitívna kontrola bol použitý nifedipín v koncentrácii  $150 \text{ nmol.l}^{-1}$ . Po tomto kroku bolo dôležité vykonávať experiment v tmavom prostredí, pretože stabilita



látky Bay-K8644 je ovplyvňovaná svetlom. Po uplynutí inkubačnej doby bol kumulatívne pridávaný Bay-K8644 v rastúcej koncentrácii od  $100 \text{ pmol.l}^{-1}$  do  $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Po ustálení konstriktnej odpovede bol nakoniec pridaný KCl  $80 \text{ mmol.l}^{-1}$  na dosiahnutie maximálnej konstriktie.

### 5.3.2 Vyhodnotenie nameraných údajov

Na vyhodnotenie nameraných dát boli použité programy Microsoft Excel a GraphPad Prism 9.

#### Vyhodnotenie screeningu vazodilatačných látok

U jednotlivých polyfenolických látok a aj u jednotlivých koncentrácií zahrnutých do screeningu boli zaznamenané hodnoty, pri ktorých dochádzalo k dilatácii cievy. Tieto údaje boli vyhodnotené percentuálne z maximálnej možnej relaxácie. Za maximálnu hodnotu bola považovaná hodnota dilatácie navodená pomocou NTS  $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  v závere každého experimentu. Významnosť bola vyhodnotená pomocou prekryvu konfidenčných intervalov. Vyhodnotenie závislosti vazodilatácie na prítomnosti endotelu, vplyvu tamarixetínu na aktiváciu solubilnej guanylátcyklázy a kanálov  $K_{Ca}$ ,  $K_{ir}$ ,  $K_{ATP}$ ,  $K_V$  a  $K_{V7}$  v hladkom cievnom svale prebiehalo rovnako ako vyhodnotenie výsledkov screeningu.

#### Vyhodnotenie vplyvu tamarixetínu na relaxáciu navodenú NTS a forskolínom

Hodnoty vazodilatácie, navodenej NTS alebo forskolínom, boli vyjadrené ako percentá z prekontrakcie navodenej KCl v koncentrácii  $40 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Na vyhodnotenie významnosti bola opäť použitá metóda prekryvu konfidenčných intervalov.

#### Vyhodnotenie vplyvu tamarixetínu na aktiváciu proteínkinázy G

Dilatácia navodená tamarixetínom bola vyjadrená v percentách z maximálnej možnej navodenej nitroprusidom sodným v koncentrácii  $10 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  v závere experimentu. Významnosť bola vyhodnotená pomocou t-testu.

#### Vyhodnotenie vplyvu tamarixetínu na L-typ vápnikových kanálov

Hodnoty kontrakcie cievy pomocou látky Bay-K8644 boli vyjadrené percentuálne. Za maximálnu hodnotu kontrakcie bola považovaná kontrakcia vyvolaná KCl  $80 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Významnosť bola vyhodnotená pomocou testu two-way ANOVA s následným Dunettovým testom.

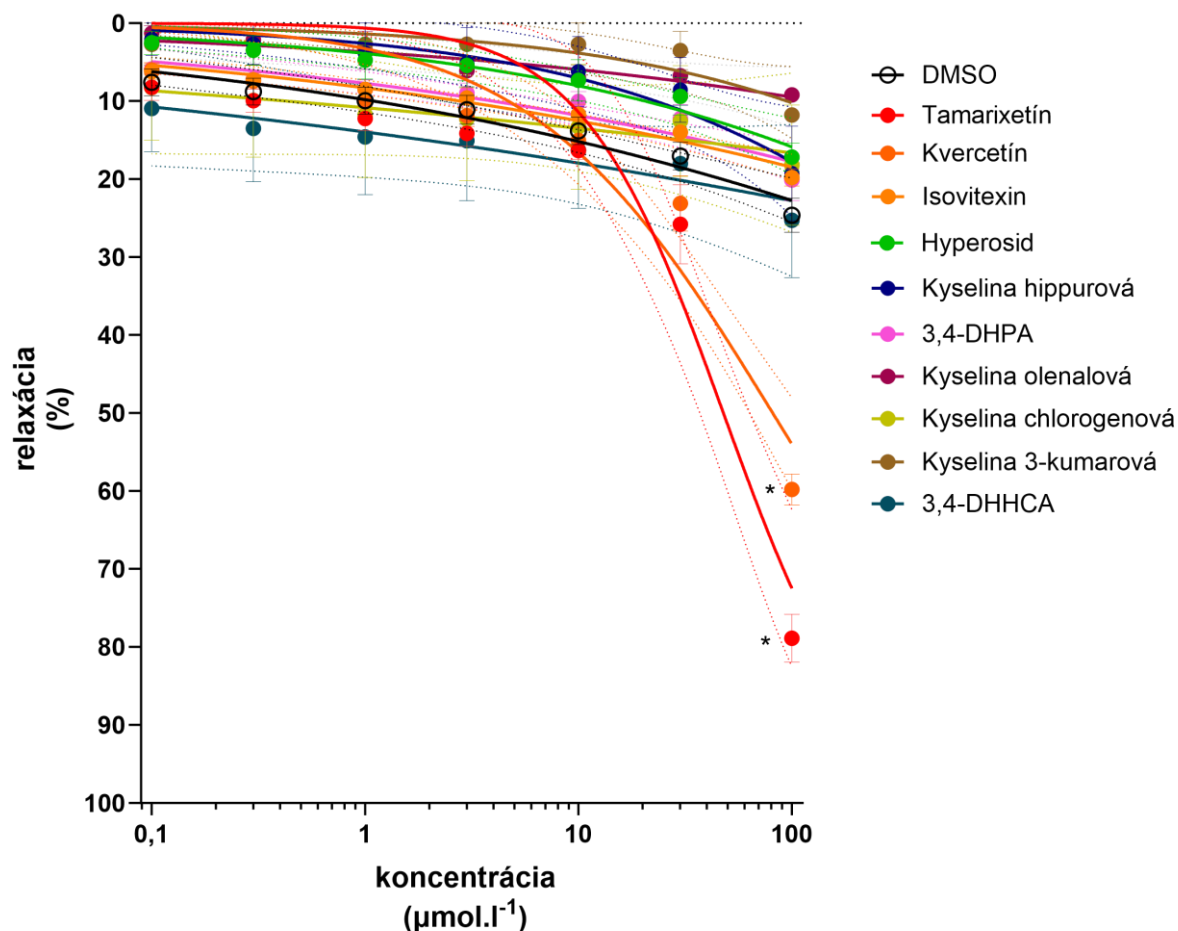
## 6 VÝSLEDKY

### 6.1.1 Screening

Látka	EC <sub>50</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> ) (CI <sub>95</sub> )	N
Isovitexin	neúčinná	2
Hyperosid	neúčinná	2
Quercetin	81,3* (61,4-107,7)	5
Kyselina chlorogenová	neúčinná	3
Kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová	neúčinná	5
Kyselina 3,4- dihydroxyhydroskořicová	neúčinná	3
Kyselina hippurová	neúčinná	3
Kyselina 3-kumarová	neúčinná	3
Kyselina olenalová	neúčinná	3
Tamarixetín	47,8* (36,8-62,0)	4

**Tab. 6: Vazodilatačný účinok desiatich vybraných obsahových látok z hlohu**

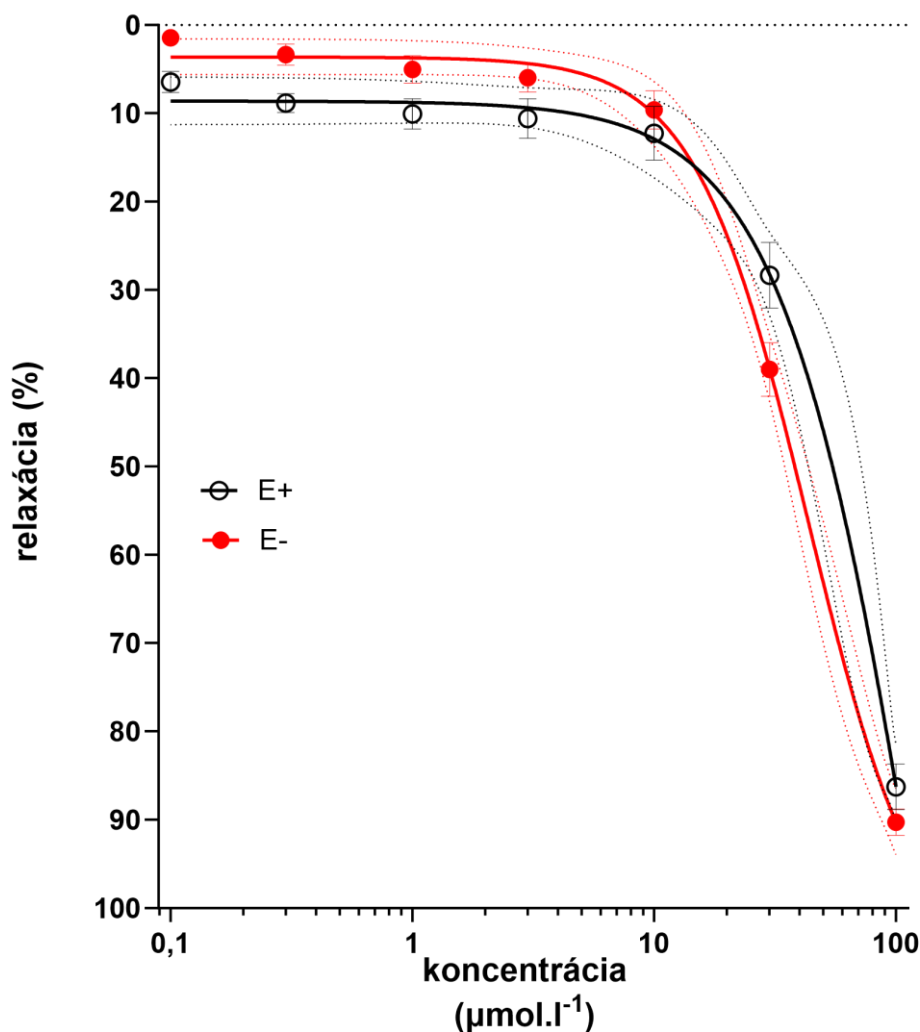
Tabuľka obsahuje súhrn vazodilatačných účinkov 10 vybraných obsahových látok hlohu, ktoré boli zahrnuté do screeningu vazodilatačných účinkov na *ex vivo* modeli koronárnej prasacej artérie, ktorá bola prekontrahovaná KCl 40 mmol.l<sup>-1</sup>. N je počet krúžkov artérií z rôznych zvierat. Vazodilatačné účinky sú vyjadrené pomocou EC<sub>50</sub> a konfidenčného intervalu CI<sub>95</sub>. Hodnoty látok boli porovnané s kontrolou – DMSO porovnaním 95% konfidenčných intervalov. \**p* ≤ 0,05.



**Obr. 3: Vazodilatačný účinok desiatich vybraných obsahových látok z hlohu**

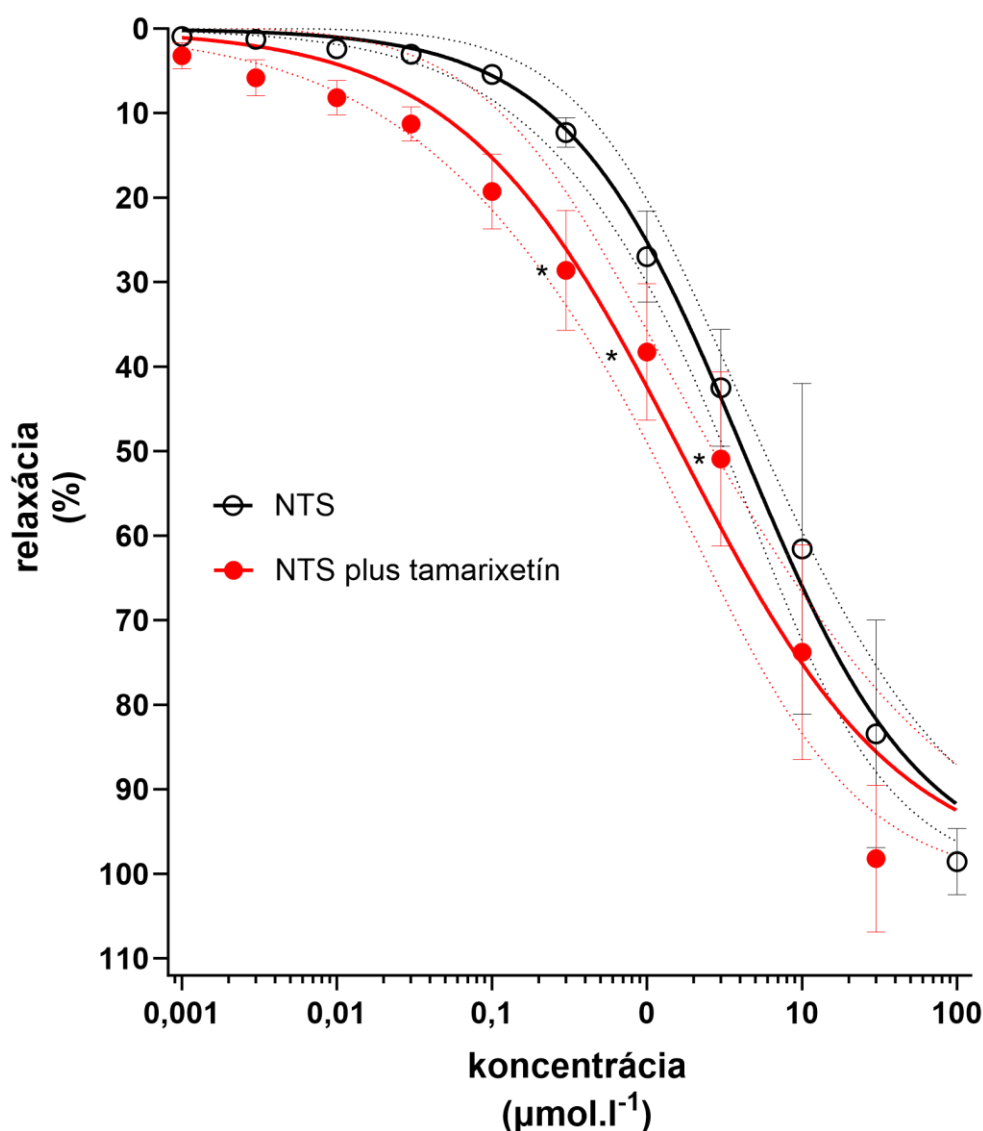
Graf zobrazuje vazodilatačné účinky 10 vybraných obsahových látok hlohu, ktoré boli testované na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie prekontrahovanej pomocou KCl 40 mmol.l<sup>-1</sup>. Relaxácia cievy bola zmeraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej novej relaxácie, ktorá bola na záver experimentu navodená nitroprusidom sodným 100 μmol.l<sup>-1</sup>. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM a konfidenčný interval 95%. U látok, ktoré nemali vazodilatačný účinok boli použité 2 až 3 cievne krúžky (s výnimkou látky 3,4-DHPA, kde bolo použitých 5 krúžkov) a u látok účinných boli účinky overené na 4 (tamarixetín) až 5 (quercetín) krúžkoch. Krúžky boli získané vždy z rôznych zvierat. Relaxácia vplyvom kontroly – rozpúšťadla DMSO – je tiež v grafe zaznamenaná. Skratky látok sú vysvetlené v Tab. 3.

### 6.1.2 Mechanizmus účinku najúčinnnejšej látky - tamarixetínu



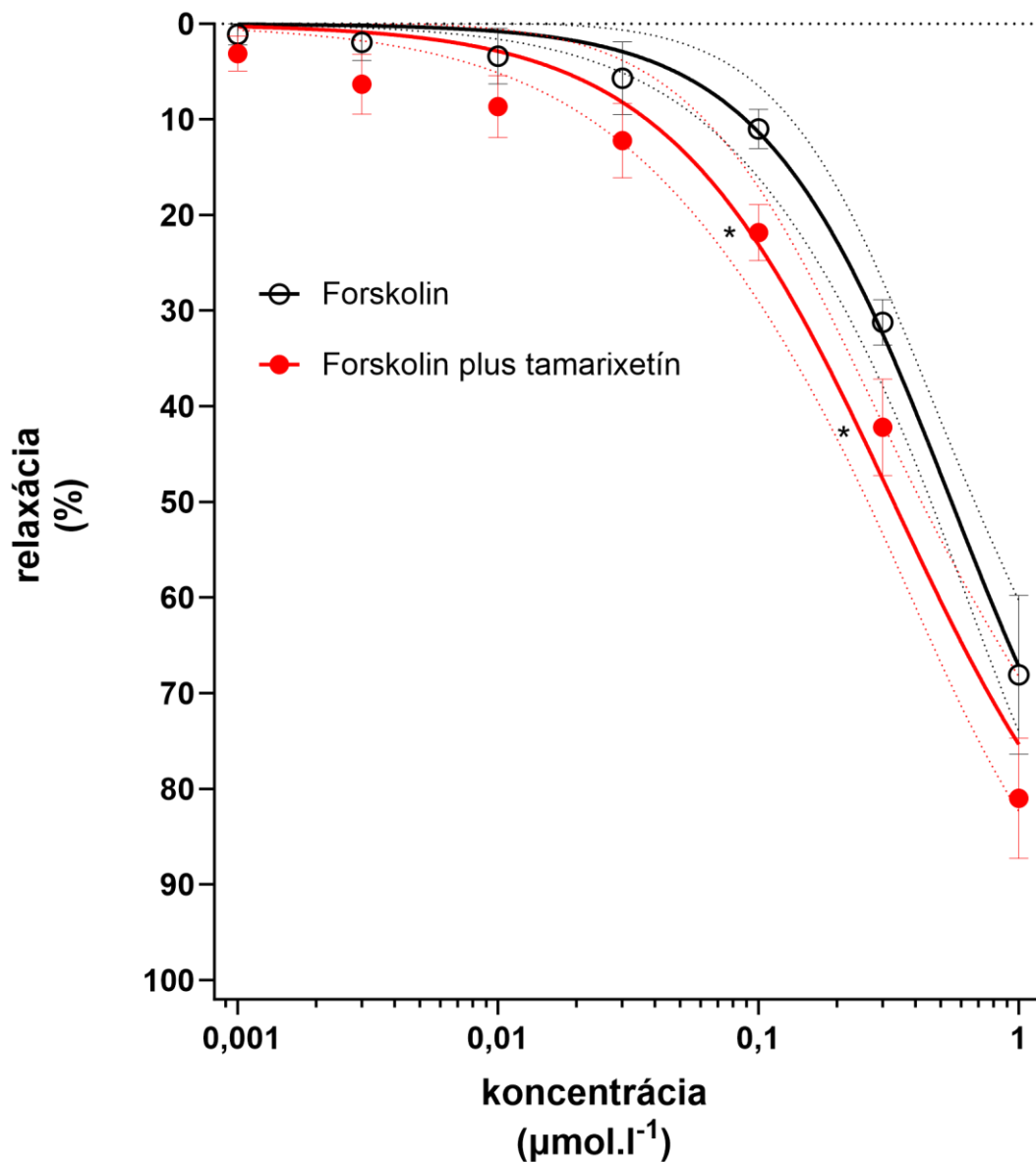
**Obr. 4:** Závislosť vazodilatačného účinku tamarixetínu na prítomnosti endotelu

Graf zobrazuje na osi X koncentráciu kumulatívne podávaného tamarixetínu, ktorá vyvolala relaxáciu zobrazenú na osi Y na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie prekontrahovanej pomocou  $\text{KCl } 40 \text{ mmol.l}^{-1}$ . Relaxácia bola zmeraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej možnej relaxácie, ktorá bola na záver experimentu navodená pomocou nitroprusidu sodného  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ . Hodnoty sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM a konfidenčný interval 95% v oboch prípadoch zo 4 krížkov (meraní), ktoré pochádzali z rôznych zvierat. E+ je cieva so zachovaným endotelom a E- je cieva bez endotelu. Medzi krivkami E+ a E- nebol významný rozdiel.



**Obr. 5: Vplyv tamarixetínu na vazodilatáciu navodenú pomocou nitroprusidu sodného**

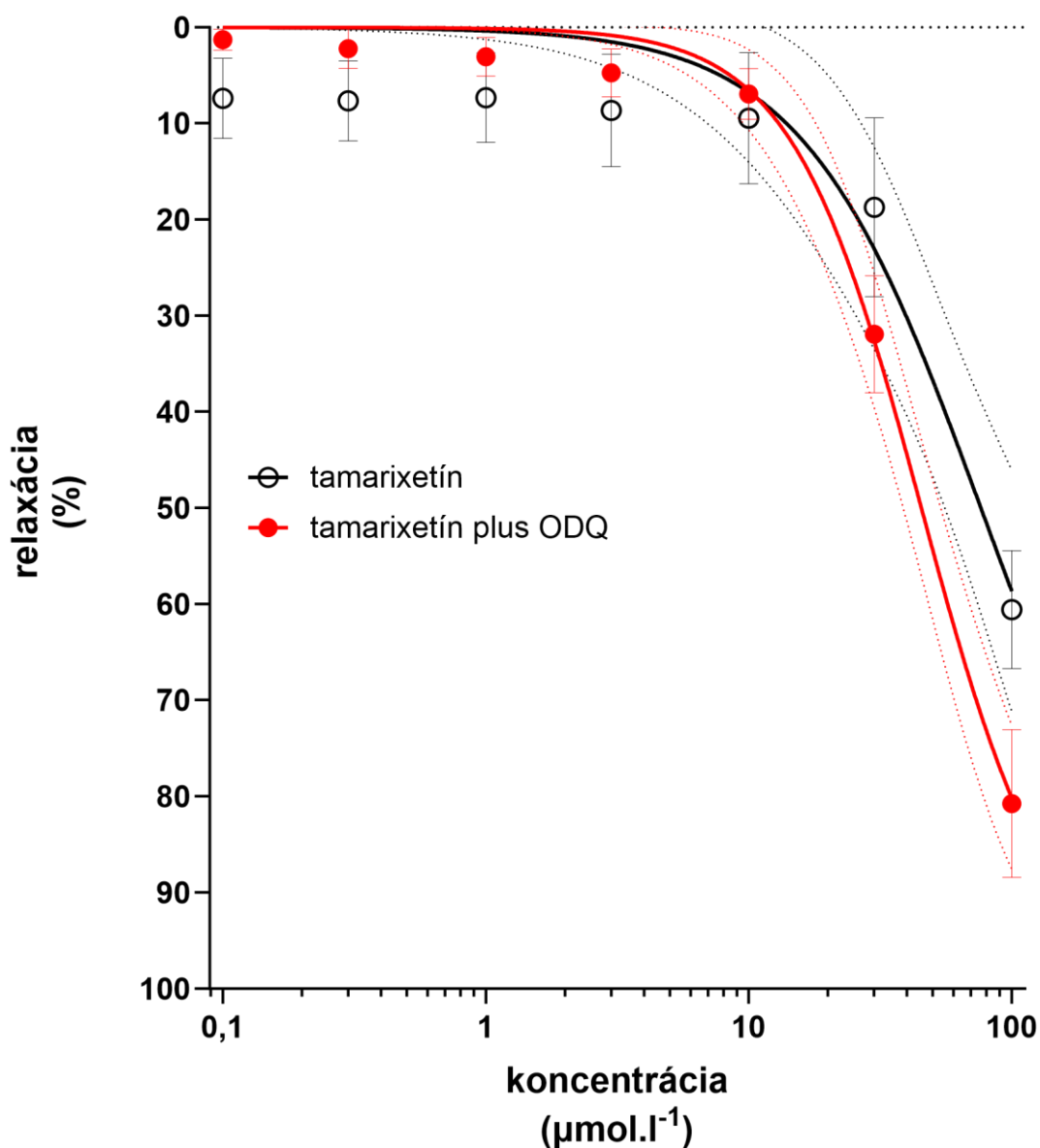
Graf zobrazuje vplyv podania tamarixetínu na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie prekontrahovanej pomocou KCl 40 mmol.l<sup>-1</sup> na relaxáciu vyvolanú následným kumulatívnym podávaním NTS vo vzrastajúcich koncentráciách. Relaxácia bola meraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej novej navodenej NTS 100 µmol.l<sup>-1</sup> v závere experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM a konfidenčný interval 95% pričom u tamarixetínu bolo použitých 6 krúžkov (meraní) a pri kontrole DMSO boli použité 4 merania. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat. \* $p \leq 0,05$ .



**Obr. 6:** Vplyv tamarixetínu na vazodilatáciu navodenú pomocou forskolínu.

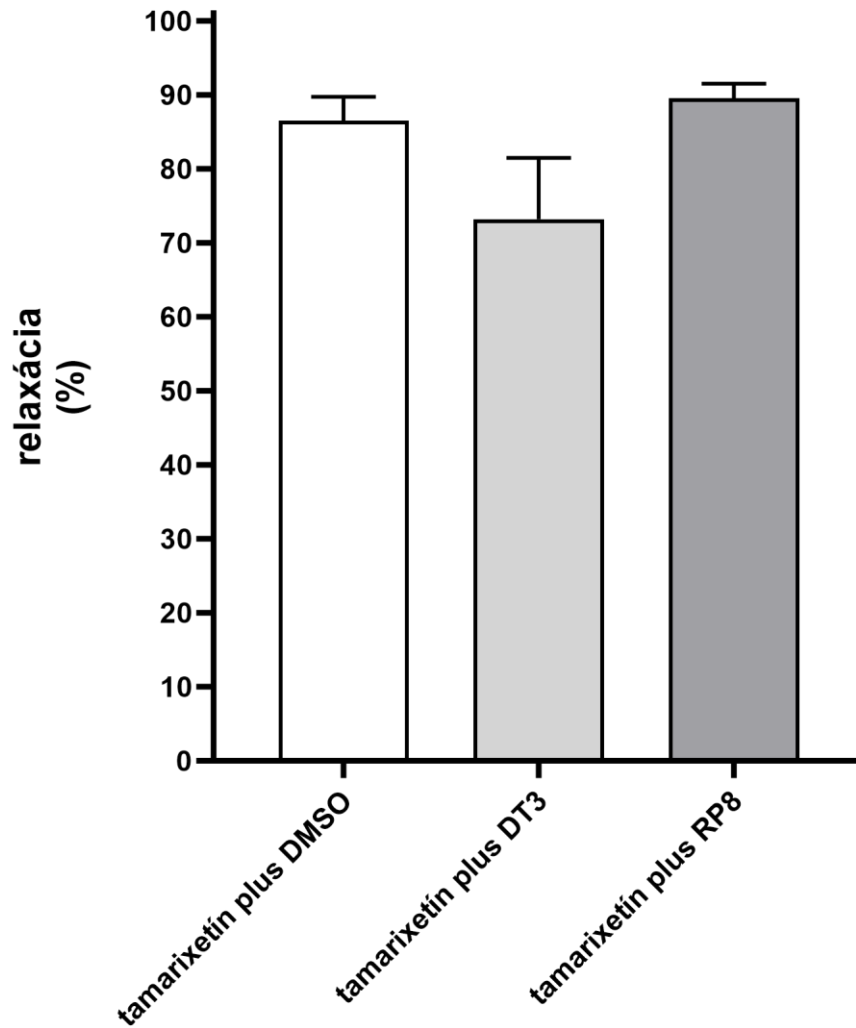
Graf zobrazuje vplyv podania tamarixetínu na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie prekontrahovanej pomocou  $\text{KCl } 40 \text{ mmol.l}^{-1}$  na relaxáciu vyvolanú následným kumulatívnym podávaním forskolínu vo vzrastajúcich koncentráciách. Relaxácia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej možnej navodenej forskolínom  $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM a konfidenčný interval 95% pričom u tamarixetínu bolo použitých 6 krúžkov (meraní) a pri kontrole DMSO boli použité 3 merania. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat.

\* $p \leq 0,05$ .



**Obr. 7: Vplyv tamarixetínu na aktiváciu solubilnej guanylátacyklázy**

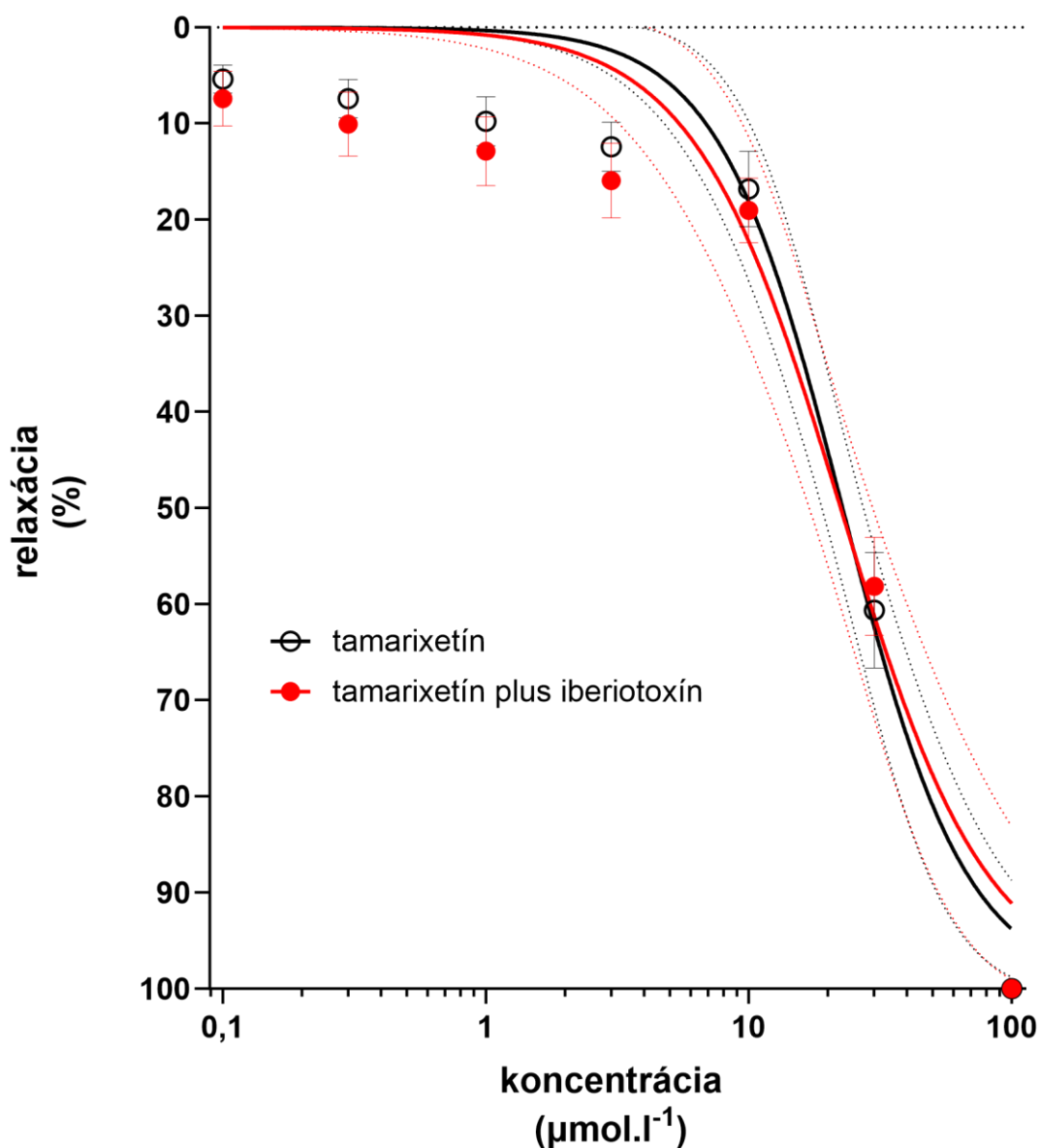
Graf zobrazuje relaxáciu navodenú na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie po predošlom podaní ODQ a po uplynutí inkubačnej doby prekontrahovanej pomocou KCl  $40 \text{ mmol.l}^{-1}$  kumulatívne podávaným tamarixetínom vo vzrastajúcich koncentráciách. Relaxácia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej novej navodenej NTS  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM a konfidenčný interval 95% pričom krúžky s ODQ boli použité 4 a pri kontrole DMSO tiež 4 merania. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat.



**Obr. 8: Vplyv tamarixetínu na aktiváciu proteínkinázy G**

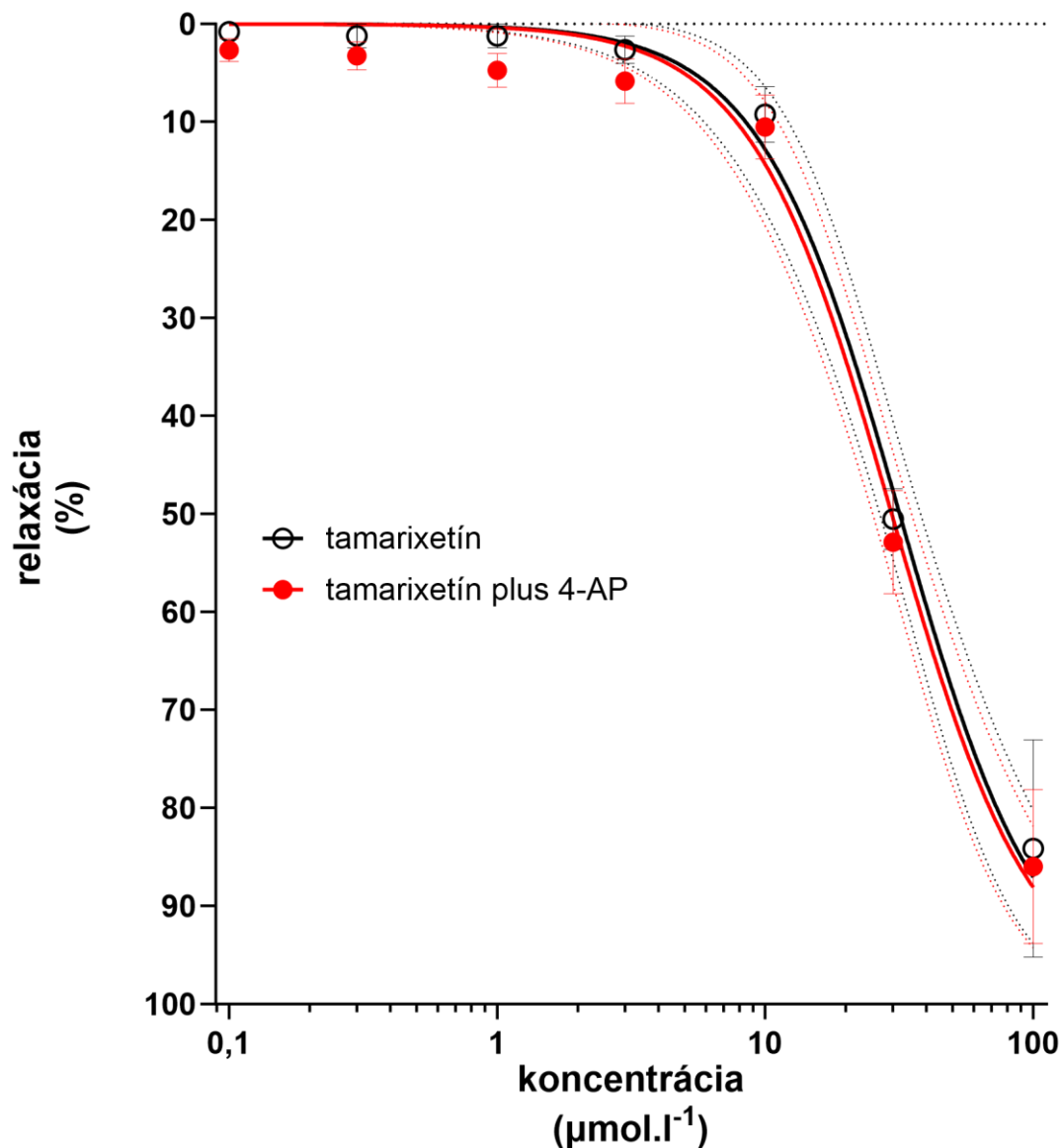
Graf zobrazuje relaxáciu navodenú na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie po predošlom podaní DT-3 alebo Rp-8-pCPT-cGMPs a po uplynutí inkubačnej doby prekontrahovanej pomocou KCl 40 mmol.l<sup>-1</sup> jedorázovo podaným tamarixetínom v koncentrácii EC<sub>80</sub> 70 μmol.l<sup>-1</sup>. Relaxácia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej novej navodenej NTS 100 μmol.l<sup>-1</sup> na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM pričom krúžkov s DT-3 alebo Rp-8-pCPT-cGMPs bolo použitých 5 a pri kontrole DMSO boli použité 3 merania. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat.





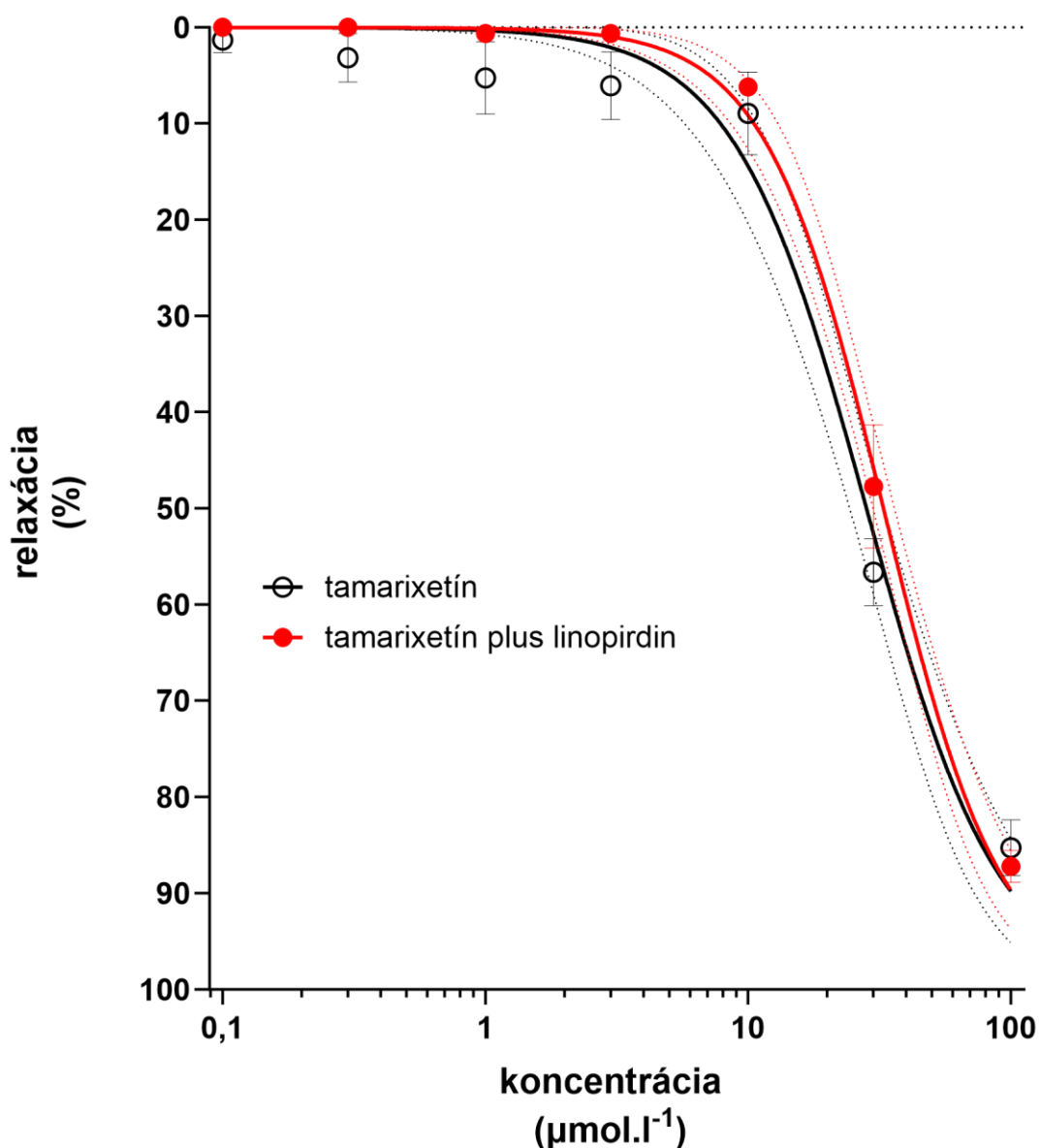
**Obr. 9:** Vplyv tamarixetínu na  $K_{Ca}$  kanály v hladkom cievnom svale

Graf zobrazuje relaxáciu navodenú na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie po predošlom podaní iberiotoxínu a po uplynutí inkubačnej doby prekontrahovanej pomocou  $KCl$   $40 \text{ mmol.l}^{-1}$  kumulatívne podávaným tamarixetínom vo vzrastajúcich koncentráciách. Relaxácia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej možnej navodenej NTS  $100 \text{ µmol.l}^{-1}$  na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM a konfidenčný interval 95% pričom krúžky s iberiotoxínom boli použité 3 a pri kontrole DMSO boli použité 4 merania. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat.



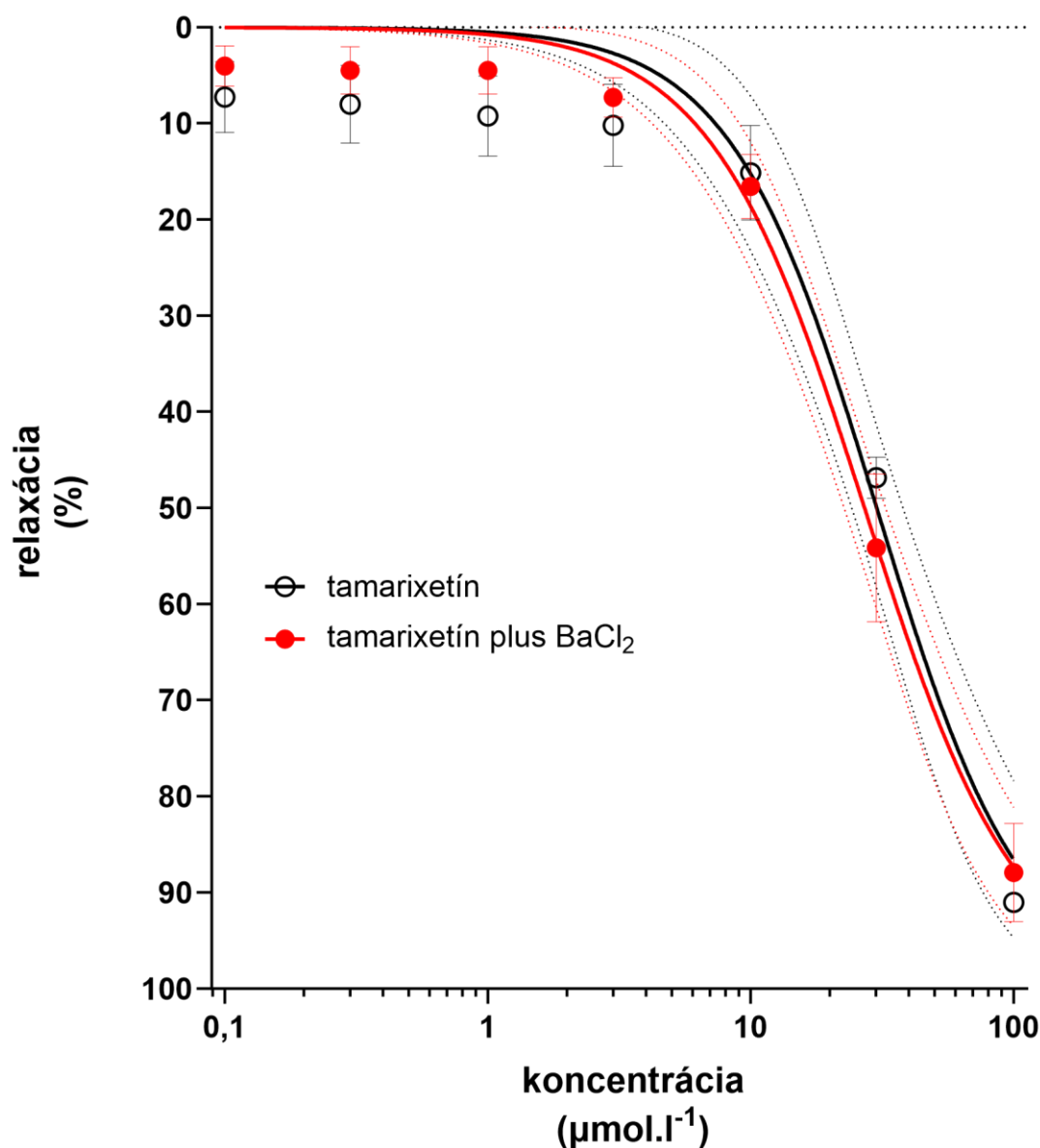
**Obr. 10:** Vplyv tamarixetínu na  $K_v$  kanály v hladkom cievnom svalce

Graf zobrazuje relaxáciu navodenú na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie po predošlom podaní 4-aminopyridínu a po uplynutí inkubačnej doby prekontrahovanej pomocou  $KCl$   $40 \text{ mmol.l}^{-1}$  kumulatívne podávaným tamarixetínom vo vzrastajúcich koncentráciách. Relaxácia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej novej navodenej NTS  $100 \text{ µmol.l}^{-1}$  na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM a konfidenčný interval 95% pričom krúžkov s 4-aminopyridínom bolo použitých 5 a pri kontrole DMSO boli použité 3 merania. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat.



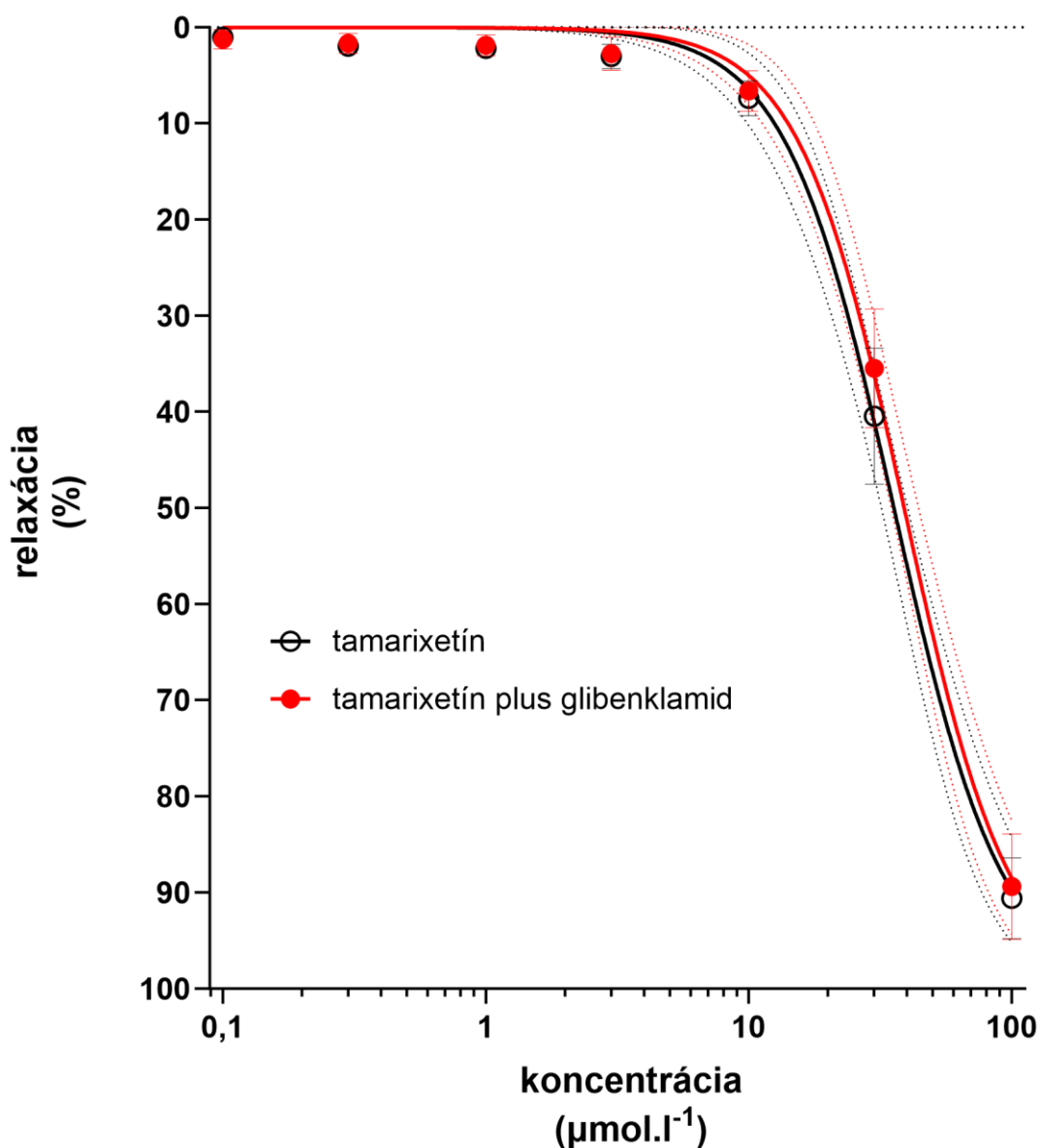
**Obr. 11:** Vplyv tamarixetínu na Kv7 podtyp kanálov v hladkom cievnom svale

Graf zobrazuje relaxáciu navodenú na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie po predošlom podaní linopirdinu a po uplynutí inkubačnej doby prekontrahovanej pomocou KCl  $40 \text{ mmol.l}^{-1}$  kumulatívne podávaným tamarixetínom vo vzrastajúcich koncentráciách. Relaxácia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej možnej navodenej NTS  $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$  na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM a konfidenčný interval 95% pričom krúžky s linopirdinom boli použité 4 a pri kontrole DMSO boli použité 4 merania. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat.



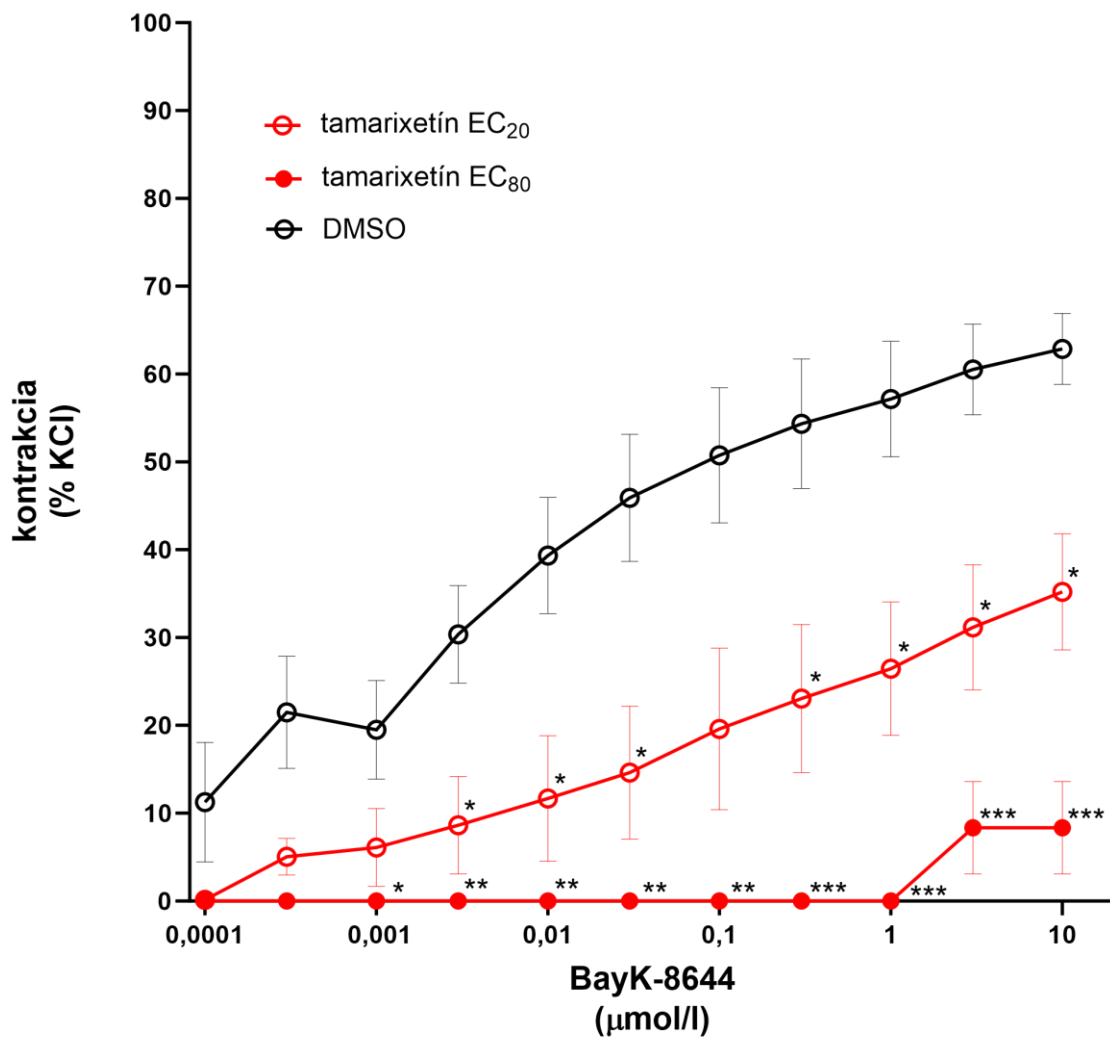
**Obr. 12:** Vplyv tamarixetínu na  $K_{ir}$  kanály v hladkom cievnom svale

Graf zobrazuje relaxáciu navodenú na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie po predošlom podaní  $BaCl_2$  a po uplynutí inkubačnej doby prekontrahovanej pomocou  $KCl$   $40 \text{ mmol.l}^{-1}$  kumulatívne podávaným tamarixetínom vo vzrastajúcich koncentráciách. Relaxácia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej novej navodenej NTS  $100 \text{ μmol.l}^{-1}$  na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM a konfidenčný interval 95% pričom krížky s  $BaCl_2$  boli použité 3 a pri kontrole DMSO tiež 3 merania. Krížky pochádzali vždy z rôznych zvierat.



**Obr. 13:** Vplyv tamarixetínu na  $K_{ATP}$  kanály v hladkom cievnom svale

Graf zobrazuje relaxáciu navodenú na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie po predošlom podaní glibenklamidu a po uplynutí inkubačnej doby prekontrahovanej pomocou  $\text{KCl } 40 \text{ mmol.l}^{-1}$  kumulatívne podávaným tamarixetínom vo vzrastajúcich koncentráciách. Relaxácia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej možnej navodenej NTS  $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$  na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM a konfidenčný interval 95% pričom krúžky s glibenklamidom boli použité 4 a pri kontrole DMSO boli použité 4 merania. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat.



**Obr. 14:** Vplyv tamarixetínu na L-*typ* vápnikových kanálov

Graf zobrazuje vplyv podania dvoch koncentrácií tamarixetínu EC<sub>20</sub> 30 µmol.l<sup>-1</sup> alebo EC<sub>80</sub> 70 µmol.l<sup>-1</sup> na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie stimulovanej pomocou KCl 15 mmol.l<sup>-1</sup> na vazokonstrikciu vyvolanú následným kumulatívnym podávaním BayK-8644 vo vzrastajúcich koncentráciách. Kontrakcia bola nameraná izometricky a vyjadrená percentuálne z maximálnej novej navodenej KCl 80 mmol.l<sup>-1</sup> na záver experimentu. Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM pričom u tamarixetínu bolo použitých 5 a 6 krúžkov (meraní) a pri kontrole DMSO bolo použitých 7 meraní. Krúžky pochádzali vždy z rôznych zvierat. \**p* ≤ 0,05, \*\**p* ≤ 0,01, \*\*\**p* ≤ 0,001.

## 7 DISKUSIA

Ochorenia kardiovaskulárneho systému sú celosvetovo jednou z najčastejších príčin úmrtí. Postihujú srdce a krvné cievy a zahŕňajú stavy ako arterioskleróza, vysoký krvný tlak, infarkt myokardu, ischemická choroba srdca, ischemická choroba dolných končatín, cievna mozgová príhoda a zlyhanie srdca. Aj napriek veľkému pokroku a inováciám zaznamenaných v liečbe týchto ochorení, je potrebné aby boli vyvíjané nové terapeutické intervencie, ktoré by ich prevalenciu a mortalitu pomohli znižovať. Tieto nové prístupy môžu mať pôvod v prírodných látkach. Hloh je tradičná liečivá rastlina, ktorá je využívaná v terapii ochorení gastrointestinálneho ale hlavne kardiovaskulárneho systému. Medzi jeho hlavné pôsobenia patria: antioxidačné (prevencia poškodenia cievneho endotelu a potláčanie zápalových procesov), antihyperlipidemické (redukcia výskytu lézií spolu so znižovaním hladiny aterogénnych lipoproteínov) a vazodilatačné.

V hlohu sa nachádza viacero obsahových látok. Cieľom tejto diplomovej práce bolo vybrať 10 z nich a vykonaním príslušných testov overiť, či majú vazodilatačné účinky na koronárne cievy a akým mechanizmom prípadná vazodilatácia prebieha. Na testovanie boli zvolené ako model prasacie koronárne cievy *ex vivo*, pretože týmto typom modelu bolo možné obmedziť spotrebu laboratórných zvierat podľa princípu 3R, zároveň je anatomicky aj fyziológiou prasacie srdce veľmi podobné ľudskému.

Pre zistenie, ktoré obsahové látky z hlohu sú vazodilatačne účinné bol vykonaný screening na 10 polyfenolických látkach. Z týchto látok boli vazodilatačne neúčinné všetky s výnimkou quercetínu a tamarixetínu (vid' Obr.3), ktorý sa ukázal ako najúčinnější s hodnotou  $EC_{50}$  47,8  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  (vid' Tab. 6). Tamarixetín bol ako najúčinnější derivát podrobený ďalšiemu testovaniu, ktoré malo za úlohu overiť jeho mechanizmus účinku.

Najskôr bolo potrebné zistiť, či je vazodilatačný účinok tamarixetínu závislý na prítomnosti funkčného cievneho endotelu. Zistilo sa, že vazodilatácia na prítomnosti endotelu nezávisí (vid' Obr. 4) a tamarixetín pravdepodobne pôsobí priamo na hladký cievny sval. Následne teda nebolo potrebné skúmať ďalší možný vplyv tamarixetínu na endotel a výskum bol zameraný na mechanizmy, ktoré boli spojené s hladkým cievny svalom.

Pred samotným testovaním mechanizmov bolo potrebné ešte raz overiť vplyv tamarixetínu na vazodilatáciu. Tá bola navodená pomocou dvoch známych vazodilatátorov – nitroprusidu sodného (donor NO, ktorý aktivuje solubilnú guanylátcyklázu v hladkom cievnom svale, čo vedie k zvýšeniu produkcie cGMP z GTP, a následným aktivovaním proteínkinázy G spôsobuje vazodilatáciu) (viď Obr. 5) a forskolínu (potencuje aktivitu adenylátcyklázy, čo vedie k zvýšenej tvorbe cAMP z ATP, následnej aktivácii proteínkinázy A a vazodilatácii) (viď Obr. 6). Prítomnosť tamarixetínu signifikantne zvýšila účinok oboch vazodilatátorov a keďže pôsobia iným mechanizmom, bolo potrebné nájsť mechanizmus, ktorý je spoločný pre obe látky.

Potenciálny spoločný mechanizmus pre testovanie sa ukázali membránové iónové kanály, ktorých aktivita (a kvôli tomu aj koncentrácie iónov) je rozhodujúca pre polarizáciu bunkovej membrány a nasledujúcu vazokonstrikciu alebo vazodilatáciu. Draslíkové kanály hrajú dôležitú úlohu v regulácii membránového potenciálu, ktorý je určujúci pre otvorenie napätovo riadených  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov a uvoľňovanie vnútrobunkových zásob vápnika. Keď sa draslíkové kanály, ktoré sa nachádzajú na membráne buniek hladkého cievneho svalu otvoria, dochádza k hyperpolarizácii membrány, uzavretiu napätovo riadených vápnikových kanálov a následné zníženie koncentrácie vápnika vedie k vazodilatácii. Naopak pri uzatvorení draslíkových kanálov dochádza k depolarizácii a otvoreniu napätovo riadených  $\text{Ca}^{2+}$  kanálov, pričom následné zvýšenie hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  spôsobuje vazokonstrikciu.

Prvý testovaný mechanizmus bol vnútrobunkový, konkrétne, či tamarixetín aktivuje solubilnú guanylátcyklázu, ktorá je zodpovedná za tvorbu cGMP a ako je už vyššie opísané, zúčastňuje sa vazodilatácie. Bolo zistené, že mechanizmus účinku tamarixetínu nie je aktivácia sGC, pretože prítomnosť jej inhibítora, látky ODQ, neinhibovala vazodilatáciu navodenú tamarixetínom (viď Obr. 7).

Druhým skúšaným mechanizmom bolo, či tamarixetín aktivuje proteínkinázu G. Proteínkináza G je špecifická proteínkináza, ktorá po aktivovaní cez cGMP fosforyluje serínové a threonínové štruktúry bunkových proteínov, čím moduluje ich funkciu a vedie k vazodilatácii (Francis SH et al. 2010). Aktivácia proteínkinázy G, bola ako možný mechanizmus vylúčená tiež, pretože prítomnosť jej inhibítora – v prvom experimente látky DT-3 v druhom látky RP-8-pCPT-cGMPs – nespôsobila inhibíciu vazodilatácie navodenej tamarixetínom (viď Obr. 8).



Tretím skúšaným mechanizmom bolo, či má tamarixetín vplyv na draslíkové kanály aktivované zvýšenou hladinou vápnika. Iberiotoxín sa viaže na vonkajšie vyústenie  $BK_{Ca}$ , čím je schopný ich zablokovať a navodiť dlhotrvajúci nevodivý stav membrány (Candia S et al. 1992). Avšak prítomnosť tohto inhibítora neinhibovala vazodilatáciu navodenú tamarixetínom (vid' Obr. 9), teda tamarixetín cez  $BK_{Ca}$  nepôsobí. Napriek tomu bolo potrebné overiť, či tamarixetín nepôsobí cez ďalšie typy draslíkových kanálov.

Štvrtým testovaným mechanizmom bolo, či má tamarixetín vplyv na napäťovo riadené draslíkové kanály a ich podtyp  $K_{V7}$  špecifický pre hladký cievny sval.  $K_V$  kanály sa otvárajú pri depolarizácii membrány a sú naopak uzatvárané pôsobením látok ako 4-aminopyridin. Selektívnym inhibítorom podtypu  $K_{V7}$  je linopirdin. Bolo preukázané, že vazodilatácia navodená tamarixetínom nebola inhibovaná pôsobením týchto inhibítorov a teda tamarixetín nepôsobí cez  $K_V$  kanály (4-aminopyridin vid' Obr. 10, linopirdin vid' Obr. 11).

Ako piaty mechanizmus bol testovaný vplyv tamarixetínu na  $K_{ir}$  kanály, ktoré sú regulované interakciami s G proteínmi. Skupina  $K_{ir}$  kanálov má 7 podtypov. Sú charakteristické vyššou náchylnosťou k prestupu  $K^+$  do vnútra bunky než z nej. Tieto kanály sú blokované napríklad inhibítorom chloridom bárnatým, ktorý ich inhibíciou spôsobuje depolarizáciu membrány a tým potencuje influx a uvoľňovanie vápenatých iónov do bunky. Mechanizmus nebol potvrdený nakoľko  $BaCl_2$  neinhiboval vazodilatáciu navodenú tamarixetínom (vid' Obr. 12).

Šiestym skúšaným mechanizmom bolo, či má tamarixetín vplyv na  $K_{ATP}$  kanály, ktoré sa otvárajú, keď je hladina ATP nízka. Tento typ kanálov je inhibovaný derivátmi sulfonylurey, napríklad glibenklamidom. Avšak glibenklamid neinhiboval vazodilatáciu navodenú tamarixetínom (vid' Obr. 13), takže ani tento typ mechanizmu sa nepotvrdil.

Siedmym mechanizmom, ktorý bol testovaný, bol potenciálny vplyv tamarixetínu na L-typ napäťovo riadených  $Ca^{2+}$  kanálov, ktoré slúžia ako hlavný zdroj vápnika v hladkom cievnom svale a spôsobujú vazokonstrikciu po vytvorení komplexu vápnika s kalmodulínom a následnej aktivácii MLCK. Sú aktivované látkou BayK 8644, ktorá bola použitá pri testovaní. Vazokonstrikcia navodená BayK 8644 bola znížená prítomnosťou tamarixetínu (vid' Obr. 14), pričom účinok bol závislý na dávke. Nebolo možné určiť, či tamarixetín pôsobí priamo cez L-typ  $Ca^{2+}$  kanálov alebo nepriamo – teda cez štruktúru, ktorá ich ovplyvňuje.

Konkrétny mechanizmus vazodilatačného pôsobenia tamarixetínu sa zatiaľ nepodarilo odhaliť. Sú potrebné ďalšie experimenty, ktoré by overili iné potenciálne mechanizmy. Jednou z hlavných otázok zostáva, akým spôsobom tamarixetín ovplyvňuje L-typ vápnikových kanálov, a ak je tento spôsob nepriamy, je potrebné odhaliť štruktúru (pravdepodobne vnútrobunkovú), cez ktorú prebieha vazodilatácia.

Táto diplomová práca je súčasťou širšieho výskumu, ktorého plánom je overiť vazodilatačné mechanizmy tamarixetínu aj na iných modeloch, napríklad *in vivo* na hypertenzných potkanoch.

## 8 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo vykonať screening vazodilatačných účinkov desiatich obsahových látok hlohu na *ex vivo* modeli prasacej koronárnej artérie, vybrať zo screeningu látku vazodilatačne najúčinnnejšiu a následne overiť jej mechanizmus účinku. Najdôležitejšie zistenia sú:

V screeningu desiatich látok sa ako vazodilatačne najúčinnnejšie ukázali dve – quercetín a tamarixetín, pričom najúčinnnejším bol tamarixetín s hodnotou  $EC_{50} = 47,8 \mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Vazodilatačné účinky tamarixetínu neboli závislé na prítomnosti funkčného endotelu, pravdepodobne bol ovplyvnený priamo hladký cievny sval.

Tamarixetín dokázal potencovať vazodilatáciu navodenú nitroprusidom sodným alebo forskolínom.

Vazodilatačný účinok tamarixetínu nebol preukázaný cez vnútrobunkové štruktúry – solubilnú guanylátcyklázu a ani cez proteínkinázu G.

Nebol preukázaný vplyv tamarixetínu na draslíkové kanály  $K_V$ ,  $K_{V7}$ ,  $K_{Ca}$ ,  $K_{ir}$ ,  $K_{ATP}$  na bunkovej membráne hladkého cievneho svalu.

Tamarixetín dávkovo závisle potlačoval aktiváciu L-typu vápnikových kanálov navodenú ich agonistom a teda jeho vazodilatačné účinky pravdepodobne súvisia s týmto typom kanálov. Konkrétny mechanizmus sa v tejto práci nepodarilo zistiť.

## 9 LITERATÚRA

1. Abedi F, Omidkhoda N, Arasteh O, Ghavami V, Hosseinzadeh H. The Therapeutic Role of Rho Kinase Inhibitor, Fasudil, on Pulmonary Hypertension; a Systematic Review and Meta-Analysis. *Drug Res (Stuttg)*. 2023 Jan;73(1):5-16. Dostupné z: doi: 10.1055/a-1879-3111.
2. Abouzid SF, Ali SA, Choudhary MI. a new ferulic acid ester and other constituents from *Tamarix nilotica* leaves. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2009 Jul;57(7):740-2. Dostupné z: doi: 10.1248/cpb.57.740.
3. Ader P, Wessmann A, Wolfram S. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med*. 2000 Apr 1;28(7):1056-67. Dostupné z: doi: 10.1016/s0891-5849(00)00195-7.
4. Alizadeh SR, Ebrahimzadeh MA, O-substituted quercetin derivatives: Structural classification, drug design, development, and biological activities, a review, *Journal of Molecular Structure*, Volume 1254, 2022, 132392, ISSN 0022-2860, Dostupné z: doi: 10.1016/j.molstruc.2022.132392.
5. Alizadeh SR, Ebrahimzadeh MA. Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review. *Eur J Med Chem*. 2022 Feb 5;229:114068. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ejmech.2021.114068.
6. Alsharairi NA. Quercetin Derivatives as Potential Therapeutic Agents: An Updated Perspective on the Treatment of Nicotine-Induced Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023 Oct 15;24(20):15208. Dostupné z: doi: 10.3390/ijms242015208.
7. Barratt-Due A, Johansen HT, Sokolov A, Thorgersen EB, Hellerud BC, Reubsæet JL, Seip KF, Tønnessen TI, Lindstad JK, Pharo A, Castellheim A, Mollnes TE, Nielsen EW. The role of bradykinin and the effect of the bradykinin receptor antagonist icatibant in porcine sepsis. *Shock*. 2011 Nov;36(5):517-23. Dostupné z: doi: 10.1097/SHK.0b013e3182336a34.
8. Batiha GE, Beshbishy AM, Ikram M, Mulla ZS, El-Hack MEA, Taha AE, Algammal AM, Elewa YHA. The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. *Foods*. 2020 Mar 23;9(3):374. Dostupné z: doi: 10.3390/foods9030374.
9. Breinholt VM, Offord EA, Brouwer C, Nielsen SE, Brøsen K, Friedberg T. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chem Toxicol*. 2002 May;40(5):609-16. Dostupné z: doi: 10.1016/s0278-6915(01)00125-9.
10. Burak C, Brüll V, Langguth P, Zimmermann BF, Stoffel-Wagner B, Sausen U, Stehle P, Wolfram S, Egert S. Higher plasma quercetin levels following oral administration of an onion skin extract compared with pure quercetin dihydrate in humans. *Eur J Nutr*. 2017 Feb;56(1):343-353. Dostupné z: doi: 10.1007/s00394-015-1084-x.
11. Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost*. 2016 May;14(5):918-30. Dostupné z: doi: 10.1111/jth.13302.

12. Candia S, Garcia ML, Latorre R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channel. *Biophys J*. 1992 Aug;63(2):583-90. Dostupné z: doi: 10.1016/S0006-3495(92)81630-2.
13. Casellini CM, Barlow PM, Rice AL, Casey M, Simmons K, Pittenger G, Bastyr EJ 3rd, Wolka AM, Vinik AI. a 6-month, randomized, double-masked, placebo-controlled study evaluating the effects of the protein kinase C-beta inhibitor ruboxistaurin on skin microvascular blood flow and other measures of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care*. 2007 Apr;30(4):896-902. Dostupné z: doi: 10.2337/dc06-1699.
14. Cone J, Wang S, Tandon N, Fong M, Sun B, Sakurai K, Yoshitake M, Kambayashi J, Liu Y. Comparison of the effects of cilostazol and milrinone on intracellular cAMP levels and cellular function in platelets and cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999 Oct;34(4):497-504. Dostupné z: doi: 10.1097/00005344-199910000-00004.
15. Darsandhari, S., Dhakal, D., Shrestha, B., Lee, S., Jung, N., Jung, H.J. and Sohng, J.K. (2021), Biosynthesis of bioactive tamarixetin in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68: 531-537. Dostupné z: doi: 10.1002/bab.1958
16. Das S, Datta S, Ghosal A, Chaudhuri NR, Sundaram G, Basu S. Screening of BACE1 inhibitors with antiamyloidogenic activity: a study of flavonoids and flavonoid derivatives. *Neurosci Lett*. 2023 Jan 1;792:136965. Dostupné z: doi: 10.1016/j.neulet.2022.136965.
17. Das S, Majumder T, Sarkar A, Mukherjee P, Basu S. Flavonoids as BACE1 inhibitors: QSAR modelling, screening and in vitro evaluation. *Int J Biol Macromol*. 2020 Dec 15;165(Pt A):1323-1330. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.232.
18. de Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolffram S, Alink GM, Rietjens IM, Keijer J, Hollman PC. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr*. 2005 Jul;135(7):1718-25. Dostupné z: doi: 10.1093/jn/135.7.1718.
19. Dehghani S, Mehri S, Hosseinzadeh H. The effects of *Crataegus pinnatifida* (Chinese hawthorn) on metabolic syndrome: a review. *Iran J Basic Med Sci*. 2019 May;22(5):460-468. Dostupné z: doi: 10.22038/IJBMS.2019.31964.7678.
20. Du W, Fan HM, Zhang YX, Jiang XH, Li Y. Effect of Flavonoids in Hawthorn and Vitamin C Prevents Hypertension in Rats Induced by Heat Exposure. *Molecules*. 2022 Jan 27;27(3):866. Dostupné z: doi: 10.3390/molecules27030866.
21. Egert S, Wolffram S, Bosy-Westphal A, Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Frank J, Rimbach G, Mueller MJ. Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *J Nutr*. 2008 Sep;138(9):1615-21. Dostupné z: doi: 10.1093/jn/138.9.1615.
22. Egert S, Wolffram S, Schulze B, Langguth P, Hubbermann EM, Schwarz K, Adolphi B, Bosy-Westphal A, Rimbach G, Müller MJ. Enriched cereal bars are more effective in increasing plasma quercetin compared with quercetin from powder-filled hard capsules. *Br J Nutr*. 2012 Feb;107(4):539-46. Dostupné z: doi: 10.1017/S0007114511003242.
23. Fan, C., Li, Y., Yang, H. et al. Tamarixetin protects against cardiac hypertrophy via inhibiting NFAT and AKT pathway. *J Mol Hist* 50, 343–354 (2019). Dostupné z: doi: 10.1007/s10735-019-09831-1.

24. Fleming I, Bauersachs J, Busse R. Calcium-dependent and calcium-independent activation of the endothelial NO synthase. *J Vasc Res.* 1997 May-Jun;34(3):165-74. Dostupné z: doi: 10.1159/000159220.
25. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010 Sep;62(3):525-63. Dostupné z: doi: 10.1124/pr.110.002907.
26. Guo Y, Mah E, Bruno RS. Quercetin bioavailability is associated with inadequate plasma vitamin C status and greater plasma endotoxin in adults. *Nutrition.* 2014 Nov-Dec;30(11-12):1279-86. Dostupné z: doi: 10.1016/j.nut.2014.03.032.
27. Guo Y, Mah E, Davis CG, Jalili T, Ferruzzi MG, Chun OK, Bruno RS. Dietary fat increases quercetin bioavailability in overweight adults. *Mol Nutr Food Res.* 2013 May;57(5):896-905. Dostupné z: doi: 10.1002/mnfr.201200619.
28. Hayamizu K, Morimoto S, Nonaka M, Hoka S, Sasaguri T. Cardiotoxic actions of quercetin and its metabolite tamarixetin through a digitalis-like enhancement of Ca<sup>2+</sup> transients. *Arch Biochem Biophys.* 2018 Jan 1;637:40-47. Dostupné z: doi: 10.1016/j.abb.2017.11.009.
29. Chagas MDSS, Behrens MD, Moragas-Tellis CJ, Penedo GXM, Silva AR, Gonçalves-de-Albuquerque CF. Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds. *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Sep 6;2022:9966750. Dostupné z: doi: 10.1155/2022/9966750.
30. Chan EWC, Ng YK, Tan CY, Alessandro L, Wong SK, Chan HT. Diosmetin and tamarixetin (methylated flavonoids): a review on their chemistry, sources, pharmacology, and anticancer properties. *J Appl Pharm Sci,* 2021;11(03):022–028. Dostupné z: doi: 10.7324/JAPS.2021.110302.
31. Chen QC, Zhang WY, Jin W, Lee IS, Min BS, Jung HJ, Na M, Lee S, Bae K. Flavonoids and isoflavonoids from *Sophorae Flos* improve glucose uptake in vitro. *Planta Med.* 2010 Jan;76(1):79-81. Dostupné z: doi: 10.1055/s-0029-1185944.
32. Ijaz MU, Khalil M, Hamza A, Khatoon A. Attenuative effects of tamarixetin against polystyrene microplastics-induced hepatotoxicity in rats by regulation of Nrf-2/Keap-1 pathway. *Cell Biochem Funct.* 2023 Dec;41(8):1451-1461. Dostupné z: doi: 10.1002/cbf.3885.
33. Iwatani Y, Kosugi K, Isobe-Oku S, Atagi S, Kitamura Y, Kawasaki H. Endothelium removal augments endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric vascular bed. *Br J Pharmacol.* 2008 May;154(1):32-40. Dostupné z: doi: 10.1038/bjp.2008.72.
34. Iwatani Y, Numa H, Atagi S, Takayama F, Mio M, Kawasaki H. [Mechanisms underlying enhanced vasodilator responses to various vasodilator agents following endothelium removal in rat mesenteric resistance arteries]. *Yakugaku Zasshi.* 2007 Apr;127(4):729-33. Japanese. Dostupné z: doi: 10.1248/yakushi.127.729.
35. Jackson WF. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. *Adv Pharmacol.* 2017;78:89-144. Dostupné z: doi: 10.1016/bs.apha.2016.07.001.

36. Jones DJ, Lamb JH, Verschoyle RD, Howells LM, Butterworth M, Lim CK, Ferry D, Farmer PB, Gescher AJ. Characterisation of metabolites of the putative cancer chemopreventive agent quercetin and their effect on cyclo-oxygenase activity. *Br J Cancer*. 2004 Sep 13;91(6):1213-9. Dostupné z: doi: 10.1038/sj.bjc.6602091.
37. Krogholm KS, Bysted A, Brantsæter AL, Jakobsen J, Rasmussen SE, Kristoffersen L, Toft U. Evaluation of flavonoids and enterolactone in overnight urine as intake biomarkers of fruits, vegetables and beverages in the Inter99 cohort study using the method of triads. *Br J Nutr*. 2012 Nov 28;108(10):1904-12. Dostupné z: doi: 10.1017/S0007114512000104.
38. Lang IM, Campean IA, Sadushi-Kolici R, Badr-Eslam R, Gerges C, Skoro-Sajer N. Chronic Thromboembolic Disease and Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Clin Chest Med*. 2021 Mar;42(1):81-90. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ccm.2020.11.014.
39. Lau AJ, Chang TK. 3-Hydroxyflavone and structural analogues differentially activate pregnane X receptor: Implication for inflammatory bowel disease. *Pharmacol Res*. 2015 Oct;100:64-72. Dostupné z: doi: 10.1016/j.phrs.2015.07.031.
40. Lemmens KJ, Vrolijk MF, Bouwman FG, van der Vijgh WJ, Bast A, Haenen GR. The minor structural difference between the antioxidants quercetin and 4'-O-methylquercetin has a major impact on their selective thiol toxicity. *Int J Mol Sci*. 2014 Apr 30;15(5):7475-84. Dostupné z: doi: 10.3390/ijms15057475.
41. Li S, Liu J, Li Z, Wang L, Gao W, Zhang Z, Guo C. Sodium-dependent glucose transporter 1 and glucose transporter 2 mediate intestinal transport of quercetin in Caco-2 cells. *Food Nutr Res*. 2020 Jun 15;64. Dostupné z: doi: 10.29219/fnr.v64.3745.
42. Lomozová Z, Catapano MC, Hrubša M, Karličková J, Macáková K, Kučera R, Mladěnka P. Chelation of Iron and Copper by Quercetin B-Ring Methyl Metabolites, Isorhamnetin and Tamarixetin, and Their Effect on Metal-Based Fenton Chemistry. *J Agric Food Chem*. 2021 Jun 2;69(21):5926-5937. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.jafc.1c01729.
43. Lynch C 3rd, Durbin CG Jr, Fisher NA, Veselis RA, Althaus JS. Effects of dantrolene and verapamil on atrioventricular conduction and cardiovascular performance in dogs. *Anesth Analg*. 1986 Mar;65(3):252-8.
44. Maciej J, Schäff CT, Kanitz E, Tuchscherer A, Bruckmaier RM, Wolfram S, Hammon HM. Bioavailability of the flavonol quercetin in neonatal calves after oral administration of quercetin aglycone or rutin. *J Dairy Sci*. 2015 Jun;98(6):3906-17. Dostupné z: doi: 10.3168/jds.2015-9361.
45. Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett*. 1997 Jun 2;409(1):12-6. Dostupné z: doi: 10.1016/s0014-5793(97)00467-5.
46. Martinelli F, Perrone A, Yousefi S, Papini A, Castiglione S, Guarino F, Cicatelli A, Aelaei M, Arad N, Gholami M, Salami SA. Botanical, Phytochemical, Anti-Microbial and Pharmaceutical Characteristics of Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), Rosaceae. *Molecules*. 2021 Nov 30;26(23):7266. Dostupné z: doi: 10.3390/molecules26237266.

47. Martínková J, Grim J, Hojdíková H, Chládek J, Chládková J, Kulda K, Libiger J. Farmakologie pro studenty zdravotnických odborů. 2. vydanie. Praha: Grada Publishing, 2018:520.
48. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 2000 Dec;106(12):1521-30. Dostupné z: doi: 10.1172/JCI10506.
49. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec;52(4):673-751.
50. Min BS, Cuong TD, Lee JS, Shin BS, Woo MH, Hung TM. Cholinesterase inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* buds. *Arch Pharm Res.* 2010 Oct;33(10):1665-70. Dostupné z: doi: 10.1007/s12272-010-1016-5.
51. Mirzaei A, Nasr Esfahani B, Ghanadian M, Moghim S. Alhagi maurorum extract modulates quorum sensing genes and biofilm formation in *Proteus mirabilis*. *Sci Rep.* 2022 Aug 17;12(1):13992. Dostupné z: doi: 10.1038/s41598-022-18362-x.
52. Moalin M, van Strijdonck GP, Bast A, Haenen GR. Competition between ascorbate and glutathione for the oxidized form of methylated quercetin metabolites and analogues: tamarixetin, 4'-O-methylquercetin, has the lowest thiol reactivity. *J Agric Food Chem.* 2012 Sep 12;60(36):9292-7. Dostupné z: doi: 10.1021/jf302068v.
53. Nessa F, Ismail Z, Mohamed N. Xanthine oxidase inhibitory activities of extracts and flavonoids of the leaves of *Blumea balsamifera*. *Pharm Biol.* 2010 Dec;48(12):1405-12. Dostupné z: doi: 10.3109/13880209.2010.487281.
54. Niaz A, Adnan A, Bashir R, Mumtaz MW, Raza SA, Rashid U, Tan CP, Tan TB. The In Vitro  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition Activity of Various Solvent Fractions of *Tamarix dioica* and 1H-NMR Based Metabolite Identification and Molecular Docking Analysis. *Plants (Basel).* 2021 Jun 2;10(6):1128. Dostupné z: doi: 10.3390/plants10061128.
55. Nicolini F, Burmistrova O, Marrero MT, Torres F, Hernández C, Quintana J, Estévez F. Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by the flavonoid tamarixetin on human leukemia cells. *Mol Carcinog.* 2014 Dec;53(12):939-50. Dostupné z: doi: 10.1002/mc.22055.
56. Pandey KN. Genetic Ablation and Guanylyl Cyclase/Natriuretic Peptide Receptor-A: Impact on the Pathophysiology of Cardiovascular Dysfunction. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 14;20(16):3946. Dostupné z: doi: 10.3390/ijms20163946.
57. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016 Dec 29;5:e47. Dostupné z: doi: 10.1017/jns.2016.41.
58. Parajuli, Prakash, Pandey, Ramesh & Sohng, Kyung. (2018). Regiospecific biosynthesis of tamarixetin derivatives in *Escherichia coli*. *Biochemical engineering journal*, 133, 113-121. Dostupné z: 10.1016/j.bej.2018.02.004.
59. Park HJ, Lee SJ, Cho J, Gharbi A, Han HD, Kang TH, Kim Y, Lee Y, Park WS, Jung ID, Park YM. Tamarixetin Exhibits Anti-inflammatory Activity and Prevents Bacterial Sepsis by Increasing IL-10 Production. *J Nat Prod.* 2018 Jun 22;81(6):1435-1443. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00155.



60. Paulke A, Schubert-Zsilavec M, Wurglics M. Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Feb 17;832(1):109-13. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.12.043.
61. Peng W, Li Y, Zhu C, Han X, Yu B. Synthesis of tamarixetin and isorhamnetin 3-O-neohesperidoside. *Carbohydr Res.* 2005 Jul 25;340(10):1682-8. Dostupné z: doi: 10.1016/j.carres.2005.04.021.
62. Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, López-López G, Tamargo J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Jul;302(1):66-72. Dostupné z: doi: 10.1124/jpet.302.1.66.
63. Piperigkou Z, Kyriakopoulou K, Koutsakis C, Mastronikolis S, Karamanos NK. Key Matrix Remodeling Enzymes: Functions and Targeting in Cancer. *Cancers (Basel).* 2021 Mar 22;13(6):1441. Dostupné z: doi: 10.3390/cancers13061441.
64. Pourová J, Najmanová I, Vopršalová M, Migkos T, Pilařová V, Applová L, Nováková L, Mladěnka P. Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo. *Vascul Pharmacol.* 2018 Dec;111:36-43. Dostupné z: doi: 10.1016/j.vph.2018.08.008.
65. Rahmouni N, Pinto DCGA, Beghidja N, Benayache S, Silva AMS. Scabiosa stellata L. Phenolic Content Clarifies Its Antioxidant Activity. *Molecules.* 2018 May 27;23(6):1285. Dostupné z: doi: 10.3390/molecules23061285.
66. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013 Nov 9;9(10):1057-69. Dostupné z: doi: 10.7150/ijbs.7502.
67. Ramanlal R, Gupta V. Physiology, Vasodilation. [Updated 2023 Jan 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557562/>
68. Rigelsky JM, Sweet BV. Hawthorn: pharmacology and therapeutic uses. *Am J Health Syst Pharm.* 2002 Mar 1;59(5):417-22. Dostupné z: doi: 10.1093/ajhp/59.5.417.
69. Ritter JM, Flower R, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Rang and Dale's Pharmacology. 9. vydanie. Edinburgh: Elsevier, 2020.
70. Sak K, Lust H, Kase M, Jaal J. Cytotoxic action of methylquercetins in human lung adenocarcinoma cells. *Oncol Lett.* 2018 Feb;15(2):1973-1978. Dostupné z: doi: 10.3892/ol.2017.7466.
71. Shaji SK, Drishya G, Sunilkumar D, Suravajhala P, Kumar GB, Nair BG. Systematic understanding of anti-tumor mechanisms of Tamarixetin through network and experimental analyses. *Sci Rep.* 2022 Mar 10;12(1):3966. Dostupné z: doi: 10.1038/s41598-022-07087-6.
72. Shaji SK, G D, Sunilkumar D, Pandurangan N, Kumar GB, Nair BG. Nuclear factor- $\kappa$ B plays an important role in Tamarixetin-mediated inhibition of matrix metalloproteinase-9 expression. *Eur J Pharmacol.* 2021 Feb 15;893:173808. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173808.

73. Shen J, Jia Q, Huang X, Yao G, Ma W, Chang Y, Ouyang H, He J. Study on Pharmacokinetic and Bioavailability of Tamarixetin after Intravenous and Oral Administration to Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019 Dec 10;2019:6932053. Dostupné z: doi: 10.1155/2019/6932053.
74. Shunli P, Eujin L, Youn Ju L, Meihua J, Eunkyung L. The suppressive effect of tamarixetin, isolated from *Inula japonica*, on degranulation and eicosanoid production in bone marrow-derived mast cells. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2021 Jul 1;49(4):195-201. Dostupné z: doi: 10.15586/aei.v49i4.187.
75. Soltana H, De Rosso M, Lazreg H, Vedova AD, Hammami M, Flamini R. LC-QTOF characterization of non-anthocyanic flavonoids in four Tunisian fig varieties. *J Mass Spectrom*. 2018 Sep;53(9):817-823. Dostupné z: doi: 10.1002/jms.4209.
76. Song W, Wang B, Sui L, Shi Y, Ren X, Wang X, Kong X, Hou J, Wang L, Wei L, Luan Y, Guan J, Zhao Y. Tamarixetin Attenuated the Virulence of *Staphylococcus aureus* by Directly Targeting Caseinolytic Protease P. *J Nat Prod*. 2022 Aug 26;85(8):1936-1944. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.jnatprod.2c00138.
77. Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Mar 1;423(1):148-61. Dostupné z: doi: 10.1016/j.abb.2003.11.010.
78. Spencer JP, Kuhnle GG, Williams RJ, Rice-Evans C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochem J*. 2003 May 15;372(Pt 1):173-81. Dostupné z: doi: 10.1042/BJ20021972.
79. Stainer AR, Sasikumar P, Bye AP, Unsworth AJ, Holbrook LM, Tindall M, Lovgrove JA, Gibbins JM. The Metabolites of the Dietary Flavonoid Quercetin Possess Potent Antithrombotic Activity, and Interact with Aspirin to Enhance Antiplatelet Effects. *TH Open*. 2019 Jul 30;3(3):e244-e258. Dostupné z: doi: 10.1055/s-0039-1694028.
80. Sultanova N, Makhmoor T, Abilov ZA, Parween Z, Omurkamzinova VB, ur-Rahman A, Choudhary MI. Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *J Ethnopharmacol*. 2001 Dec;78(2-3):201-5. Dostupné z: doi: 10.1016/s0378-8741(01)00354-3.
81. Suomela JP, Ahotupa M, Yang B, Vasankari T, Kallio H. Absorption of flavonols derived from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans. *J Agric Food Chem*. 2006 Sep 20;54(19):7364-9. Dostupné z: doi: 10.1021/jf061889r.
82. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016 Nov 7;37(42):3232-3245. Dostupné z: doi: 10.1093/eurheartj/ehw334.
83. Verma T, Sinha M, Bansal N, Yadav SR, Shah K, Chauhan NS. Plants Used as Anti-hypertensive. *Nat Prod Bioprospect*. 2021 Apr;11(2):155-184. Dostupné z: doi: 10.1007/s13659-020-00281-x.
84. Wang HJ, Pao LH, Hsiung CH, Shih TY, Lee MS, Hu OY. Dietary flavonoids modulate CYP2C to improve drug oral bioavailability and their qualitative/quantitative structure-activity relationship. *AAPS J*. 2014 Mar;16(2):258-68. Dostupné z: doi: 10.1208/s12248-013-9549-4.

85. Wang L, Wang Y, Yang W, He X, Xu S, Liu X, He Y, Hu Q, Yuan D, Jin T. Network pharmacology and molecular docking analysis on mechanisms of Tibetan Hongjingtian (*Rhodiola crenulata*) in the treatment of COVID-19. *J Med Microbiol*. 2021 Jul;70(7):001374. Dostupné z: doi: 10.1099/jmm.0.001374.
86. Wein S, Beyer B, Zimmermann BF, Blank RH, Wolfram S. Bioavailability of Quercetin from Onion Extracts after Intraruminal Application in Cows. *J Agric Food Chem*. 2018 Oct 3;66(39):10188-10192. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.jafc.8b03049.
87. Williams S, Abbott D, Morfis L, Manwaring P, Diamond T, Howes LG. Effects of glibenclamide on blood pressure and cardiovascular responsiveness in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Hypertens*. 1998 May;16(5):705-11. Dostupné z: doi: 10.1097/00004872-199816050-00019.
88. Woodman OL, Chan ECh. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004 Nov;31(11):786-90. doi: 10.1111/j.1440-1681.2004.04072.x.
89. Wright B, Gibson T, Spencer J, Lovegrove JA, Gibbins JM. Platelet-mediated metabolism of the common dietary flavonoid, quercetin. *PLoS One*. 2010 Mar 12;5(3):e9673. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0009673.
90. Wright, B., Spencer, J. P. E., Lovegrove, J. A., & Gibbins, J. M. (2013). Flavonoid inhibitory pharmacodynamics on platelet function in physiological environments. *Food & Function*, 4(12), 1803. Dostupné z: doi:10.1039/c3fo60272a
91. Xu FQ, Feng YY, Guo L, Guo GL, Yan BL. The effective method for investigation meridian tropism theory in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2012 Dec 31;10(2):356-67. Dostupné z: doi: 10.4314/ajtcam.v10i2.23.
92. Xu J, Cai X, Teng S, Lu J, Zhou Y, Wang X, Meng Z. The Pro-Apoptotic Activity of Tamarixetin on Liver Cancer Cells Via Regulation Mitochondrial Apoptotic Pathway. *Appl Biochem Biotechnol*. 2019 Oct;189(2):647-660. Dostupné z: doi: 10.1007/s12010-019-03033-x.
93. Xu, F., Guan, H., Feng, Y. et al. Determination of tamarixetin and kaempferide in rat plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Anal Chem* 69, 574–582 (2014). Dostupné z: doi 10.1134/S106193481406015X
94. Yadav DK, Bharitkar YP, Hazra A, Pal U, Verma S, Jana S, Singh UP, Maiti NC, Mondal NB, Swarnakar S. Tamarixetin 3-O- $\beta$ -d-Glucopyranoside from *Azadirachta indica* Leaves: Gastroprotective Role through Inhibition of Matrix Metalloproteinase-9 Activity in Mice. *J Nat Prod*. 2017 May 26;80(5):1347-1353. Dostupné z: doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b00957.
95. Zeng H, Zheng T, Li Y, Chen Q, Xue Y, Tang Q, Xu H, Chen M. Characterization Variation of the Differential Coloring Substances in Rapeseed Petals with Different Colors Using UPLC-HESI-MS/MS. *Molecules*. 2023 Jul 26;28(15):5670. Dostupné z: doi: 10.3390/molecules28155670.
96. Zheng X, Li X, Chen M, Yang P, Zhao X, Zeng L, OuYang Y, Yang Z, Tian Z. The protective role of hawthorn fruit extract against high salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats: impact on oxidative stress and metabolic patterns. *Food Funct*. 2019 Feb 20;10(2):849-858. Dostupné z: doi: 10.1039/c8fo01818a.

### Elektronické zdroje

1. Abriyani,E.and Ibrahim,S.and Darwis,D., 20143352104, English, Journal article, India, 6, (8), Jaipur, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, (24–27), (2014), Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, Isolation and elucidation structure of tamarixetin glycoside from bungo perak-perak (*Begonia versicolor* Irmsch) leaves. Dostupné na URL: <http://jocpr.com/vol6-iss8-2014/JCPR-2014-6-8-24-27.pdf>
2. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Hawthorn. [Updated 2023 Jan 28]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589114/>

## ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Štruktúra tamarixetínu a quercetínu .....	15
Obr. 2: Schéma kontraktilného aparátu.....	33
Obr. 3: Vazodilatačný účinok desiatich vybraných obsahových látok z hlohu .....	51
Obr. 4: Závislosť vazodilatačného účinku tamarixetínu na prítomnosti endotelu.	52
Obr. 5: Vplyv tamarixetínu na vazodilatáciu navodenú pomocou nitroprusidu sodného .....	53
Obr. 6: Vplyv tamarixetínu na vazodilatáciu navodenú pomocou forskolínu.....	54
Obr. 7: Vplyv tamarixetínu na aktiváciu solubilnej guanylátcyklázy .....	55
Obr. 8: Vplyv tamarixetínu na aktiváciu proteínkinázy G.....	56
Obr. 9: Vplyv tamarixetínu na $K_{Ca}$ kanály v hladkom cievnom svale.....	57
Obr. 10: Vplyv tamarixetínu na $K_v$ kanály v hladkom cievnom svale.....	58
Obr. 11: Vplyv tamarixetínu na $K_v7$ podtyp kanálov v hladkom cievnom svale...	59
Obr. 12: Vplyv tamarixetínu na $K_{ir}$ kanály v hladkom cievnom svale.....	60
Obr. 13: Vplyv tamarixetínu na $K_{ATP}$ kanály v hladkom cievnom svale .....	61
Obr. 14: Vplyv tamarixetínu na L-typ vápnikových kanálov .....	62

## ZOZNAM TABULIEK

<b>Tab. 1: Vazoaktívne látky použité v diplomovej práci .....</b>	<b>40</b>
<b>Tab. 2: Vazoaktívne látky.....</b>	<b>42</b>
<b>Tab. 3: 10 polyfenolických látok z hlohu.....</b>	<b>43</b>
<b>Tab. 4: Zloženie Krebsovho roztoku .....</b>	<b>44</b>
<b>Tab. 5: Použité rozpúšťadlá .....</b>	<b>44</b>
<b>Tab. 6: Vazodilatačný účinok desiatich vybraných obsahových látok z hlohu .....</b>	<b>50</b>