

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STUDIUM ÚČINKŮ VYBRANÝCH FENOLICKÝCH LÁTEK IN
VITRO NA IZOLOVANÉ CÉVĚ POTKANA**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2019

Iveta Rajtmajerová

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

V Hradci Králové dne

Podpis

Děkuji své školitelce PharmDr. Janě Pourové, Ph.D. za odborné vedení, konstruktivní rady, vstřícný přístup a všestrannou pomoc při vypracování mé diplomové práce.

Ráda bych také poděkovala i ostatním členům výzkumné skupiny Kardiiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie, kteří se podíleli na provedení experimentální části této práce.

V neposlední řadě patří dík paní doc. Ing. Kateřině Valentové, Ph.D. a jejímu týmu z Akademie věd České republiky za poskytnutí testovaných látek.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Iveta Rajtmajerová

Školitel: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium účinků vybraných fenolických látek *in vitro* na izolované cévě potkana

Silymarinové flavolignany disponují mnoha účinky. V poslední době je diskutován nejen jejich hepatoprotektivní potenciál, ale i pozitivní působení na kardiovaskulární systém. Tato diplomová práce se zabývá vazodilatačními účinky silybinu-A, silybinu-B, silybinu-A+B a isosilybinu-A.

Cílem této práce bylo *in vitro* otestovat vazodilatační účinky vybraných látek. Během experimentů byla měřena závislost relaxace aorty, izolované z potkana kmene Wistar, na vzrůstající koncentraci testovaných látek.

Pomocí výsledných hodnot byly sestrojeny DRC křivky a stanoveny hodnoty EC₅₀. Následně se vyhodnotily výsledky.

Vazodilatační potenciál silybinu-A a isosilybinu-A je srovnatelný, poloha substituentů na účinek zřejmě nemá vliv. Byla pozorována rozdílná účinnost silybinu-A a silybinu-B, mechanismus relaxace je tudíž možná stereoselektivní. Testováním ekvimolární směsi silybinu-A+B jsme zjistili, že jednotlivé látky se pravděpodobně vzájemně nepotencují ani neinhibují. Schopnost vazodilatace klesá v řadě: isosilybin-A ~ silybin-A > silybin-A+B > silybin-B.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Iveta Rajtmajerová

Supervisor: PharmDr. Jana Pourová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The in vitro effects of selected phenolic substances on isolated rat vessels

Silymarin flavonolignans are endowed with various aspects. Recently their hepatoprotective effect has been discussed widely as well as their positive influence on the cardiovascular system. This diploma thesis is concerned with the vasodilatory effects of silybin-A, silybin-B, silybin-A + B and isosilybin-A on rat aorta.

The aim of this study was to test the vasodilatory effect of selected substances.

The dependence of aortic relaxation on the increasing concentration of tested substances was measured. Isolated Wistar breed rat aorta was used.

DRC curves were created and EC₅₀ values were assessed from the obtained values of vessel tension. The results were evaluated subsequently.

The vasodilator potential of silybin-A and isosilybin-A is comparable; hence the position of the substituents may be irrelevant in having any impact on relaxation of the vessels. Different vasodilatory effects of silybin-A and silybin-B have been observed thus, the relaxation could be stereoselective. The testing of the equimolar mixture of silybin-A and silybin-B showed that the individual substances probably did not potentiate or inhibit each other. The ability of vasodilation decreases in a row: isosilybin-A ~ silybin-A > silybin-A+B > silybin-B.

Obsah

1 Seznam zkratk	8
2 Úvod	10
3 Teoretická část	12
3.1 Cévní soustava	12
3.2 Cévy	12
3.2.1 Obecná stavba cév	12
3.2.2 Funkční klasifikace cév	15
3.2.3 Histologie aorty	17
3.3 Hladký cévní sval	17
3.3.1 Charakteristika	17
3.3.2 Klasifikace	18
3.4 Mechanismus kontrakce cév	19
3.5 Regulace krevního tlaku	20
3.6 Místní regulační mechanismy	20
3.6.1 Endotelové působky	20
3.6.2 Hormonálně-neurogenní mediátory	23
3.6.3 Enzymatická regulace	25
3.6.4 Ostatní	25
3.7 Celkové regulační mechanismy	25
3.8 Flavonoidy	27
3.8.1 Silymarin	27
4 Cíl práce	29
5 Experimentální část	30
5.1 Potřebné materiální vybavení, pokusná zvířata	30

5.1.1	Chemikálie	30
5.1.2	Testované látky	31
5.1.3	Krebsův roztok.....	32
5.1.4	Pokusná zvířata	32
5.1.5	Přístrojové vybavení	33
5.1.6	Ostatní	34
5.2	Metodika práce	34
5.2.1	Příprava	34
5.2.2	Vlastní experiment.....	36
5.2.3	Ukončení experimentu	36
5.2.4	Vyhodnocení výsledků	36
6	Výsledky.....	37
7	Diskuze.....	38
8	Závěr.....	41
9	Literatura	42
10	Přílohy	

1 Seznam zkratek

A = adrenalin

ACE = angiotenzinogen konvertující enzym

ADH = antidiuretický hormon (vasopresin)

ADP = adenosindifosfát

ANS = autonomní nervový systém

AT₂ = angiotenzin II

cGMP = cyklický guanozin monofosfát

CMP = cévní mozková příhoda

CO₂ = oxid uhličitý

COX-1 = cyklooxygenáza typu 1

COX-2 = cyklooxygenáza typu 2

DMSO = dimethylsulfoxid

DRC = křivka závislosti účinku na dávce (drug-response curve)

EDHF = endoteliální hyperpolarizující faktor

EDRF = endotelem produkovaný relaxační faktor

eNOS = endotelová syntáza oxidu dusnatého

ET₁ = endotelin-1

HDL cholesterol = vysokodenzitní cholesterol

ICHDK = ischemická choroba dolních končetin

ICHS = ischemická choroba srdeční

IP₃ = inositoltrifosfát

LDL cholesterol = nízkodenzitní cholesterol

MLCK = lehkoreťezcová myozinová kináza

NA = noradrenalin

NaCl = chlorid sodný

NF-κB = nukleární faktor *kappa* B

NO = oxid dusnatý

O₂ = kyslík

p.a. = *pro analysis*

PAF = destičky aktivující faktor

PGE₂ = prostaglandin-E₂

PGI₂ = prostacyklin, prostaglandin-I₂

ROS = volné kyslíkové radikály

SS = srdeční selhání

TXA₂ = tromboxan-A₂

VEGF = vaskulární endoteliální růstový faktor

VNS = vegetativní nervový systém

2 Úvod

Oběhová soustava plní mnoho nezbytných, životně důležitých funkcí. Skládá se ze dvou částí. Z centrálního oddílu (srdce) a periferního oddílu (cév). (Silbernagel a Despopoulos 2004)

Onemocnění týkající se oběhového systému mají vysoká morbiditní a mortalitní data. Jsou odpovědná za 30% úmrtí v celosvětovém měřítku (Kearney et al. 2005). Konkrétně v České republice to je nejčastější příčina úmrtí. V roce 2000 na kardiovaskulární komplikace zemřelo 53,4 % občanů. (Cífková et al. 2004)

Hlavní nosologickou jednotkou kardiovaskulárních onemocnění je arteriální hypertenze. (Vlček a Fialová 2010)

Arteriální hypertenze je nejčastější chronické onemocnění, které postihuje především vyšší věkové skupiny ve vyspělých zemích. Jedná se o multifaktoriální onemocnění. Při nedostatečné kompenzaci může dojít k poškození ledvin i jiných orgánových struktur (především retinopatie, encefalopatie), ke vzniku či zhoršení ICHS, SS, CMP. Ve spojení s dalšími rizikovými faktory (nedostatek fyzické aktivity, nevhodná dieta, kouření, vysoké hodnoty LDL cholesterolu, nízké hodnoty HDL cholesterolu, abdominální obezita, porušená glukózová tolerance, diabetes mellitus), se může vyvinout ateroskleróza a další onemocnění s aterosklerotickou etiopatogenezí (zejména akutní a chronické formy ICHS, ICHDK, CMP). (Vlček a Fialová 2010)

Léčiv používaných k terapii kardiovaskulárního systému je mnoho, ovšem stále se hledají inovativní přístupy, jak pozitivně ovlivnit mortalitní data. (Andreas et al. 2018)

Céva reguluje tlak a přívod krve tím, že mění svůj průsvit. Vlastní vazokonstrikce je zajištěna pomocí hladkého cévního svalů. (Trojan et al. 2003)

Mezi nadějnou skupinu látek, které by mohly příznivě působit na cévy, se řadí i flavonoidy. Jedná se o látky rostlinného původu, které jsou v přírodě hojně zastoupeny (Bravo 1998).

Spektrum účinků flavonoidů je široké. Mají antioxidační aktivitu; eliminují ROS (kyslíkové radikály), které by mohly oxidovat lipidy, a tím snižují riziko vzniku nebo rozvoje aterosklerózy. Mají schopnost vazodilatace, čímž snižují krevní tlak. Zlepšují také vlastnosti kapilár: působí antiagregačně, antiedematózně, normalizují jejich permeabilitu a lomivost. Inhibicí hyaluronidázy brání šíření bakteriální nákazy. Některé flavonoidy navíc působí i diuretický, spasmolytický, choleretický. (Kim a Je 2017, Spilková 2016)

Cílem této diplomové práce je ověřit potenciální vazodilatační účinky

silymarinu-A a silymarinu-B, jako dvou hlavních obsahových látek flavonolignanu silymarinu (Spilková 2016), jejich ekvimolární směsi (dále v textu označována jako silybin-A+B) a isosilybinu-A.

Pro experimenty byla zvolena metoda *ex vivo* izolované aorty potkana, která se v tomto typu pokusů běžně používá (Jufang a Chi 2017) a je v laboratoři katedry farmakologie a toxikologie zavedena. Součástí práce je i stručné shrnutí dosud dostupných informací o působení silymarinového komplexu na kardiovaskulární systém.

3 Teoretická část

3.1 Cévní soustava

Kardiovaskulární systém je jeden z nejdůležitějších orgánových soustav lidského organismu. Tím, že zajišťuje perfuzi tkání, splňuje několik důležitých funkcí. Jedná se zejména o funkci transportní (roznášení kyslíku/ nutrientů/ odpadních látek), regulační (termoregulace, rozvod hormonů) a ochrannou (zprostředkování imunitních reakcí, srážení krve, udržení normálního pH) (Rokyta 2015). Krev tedy díky srdci a cévám zajišťuje homeostázu vnitřního prostředí (Trojan et al. 2003).

Srdce jako pumpa rytmicky vhání okysličenou krev pomocí levé komory do celého organismu. Tomuto pohybu pomáhají i cévy svojí pružností a stahem hladké cévní stěny. Pomocí žil s chlopněmi, které zajistí jednostranný tok, se krev vrací zpět do pravé komory srdce, do malého plicního oběhu, aby se opět okysličila. (Silbernagl a Lang 2001, Čihák 1997)

3.2 Cévy

Morfologie jednotlivých typů cév se liší zejména v poměrném zastoupení jednotlivých koncentrických vrstev (*tunicae*). Rozlišujeme tři vrstvy: *tunica intima*, *tunica media*, *tunica externa* (Čihák 1997). Toto schéma ovšem neplatí pro stěnu kapilár a venul (Junquiera et al. 1997).

Základními histologickými jednotkami v těchto vrstvách jsou: endotel, hladká svalovina a vazivo. Uspořádání těchto součástí je uzpůsobeno mechanickým a metabolickým faktorům, kterým jsou cévy vystaveny. (Mescher 2018)

3.2.1 Obecná stavba cév

- **Tunica intima**

Tunica intima, někdy též nazývána *tunica interna* (Trojan et al. 2003), má jako hlavní histologickou složku endotel. Endotel je jednovrstevný dlaždicový epitel, který pokrývá lumen cév. Buňky endotelu jsou jednojaderné, ploché, mají polygonální tvar, který je protáhlý ve směru toku krve (Vajner et al. 2014). Jedná se o největší endokrinní orgán lidského organismu (Vrablík et al. 2011). Zaujímá asi 700 m² a váží přibližně 1,5 kg (Rokyta 2015).

Uspořádání, a tudíž i propustnost endotelu je různá. Pevné propojení s velice malou propustností je typické pro kapiláry hematoencefalické bariéry. Naopak jaterní kapiláry

disponují vysokou permeabilitou. Jejich stěnou, kvůli rozsáhlým fenestracím, projdou snadno i albuminy. (Trojan et al. 2003)

Endotel má mnoho funkcí. Na popud chemických signálů (acetylcholin/ ADP/ bradykinin/ angiotensin/ ADH/ trombin...) nebo vlivem mechanického stresu produkuje látky, které významně ovlivňují hemodynamiku. Tyto látky nejen regulují tonus cév, ale ovlivňují také buněčnou adhezi, tromborezistenci, proliferaci (viz Tab. 1). (Deanfield et al. 2007, Trojan et al. 2003)

Tab. 1 Látky produkované endotelem

<i>Vazodilatačně působící látky</i>		<i>Vazokonstrikčně působící látky</i>	
<i>látky</i>	<i>účinky</i>	<i>Látka</i>	<i>Účinky</i>
NO	vazodilatační antitrombotický antioxidační antiaterogenní protizánětlivý	Angiotenzin II	vazokonstrikční trombotizující
Hyperpolarizující faktor (EDHF)	vazodilatační	Endotelin-1 (ET₁)	vazokonstrikční proliferační trombotizující
Vazodilatační PGI₂ (prostacyklin)	vazodilatační antiagregační	Vazokonstrikční PAF (platelet activating factor)	vazokonstrikční podporující adhezi leukocytů

(Převzato z: Trojan et al. 2003)

U větších cév se mohou, už i v intimě, objevit snopky hladké svaloviny a řídké kolagenní vazivo. V tom případě mluvíme o subendotelové vrstvě. V arteriích subendotelovou vrstvou navíc ohraničuje *membrana elastica interna*. (Mescher 2018)

- **Tunica media**

Tunica media je tvořena především hladkými svalovými buňkami. Ty svojí produkcí kolagenu, elastinu a proteoglykanů, vytvářejí další součást vrstvy – základní vazivovou hmotu tvořenou kolagenním vazivem a elastickou membránou. Elastin je nepropustný, jsou

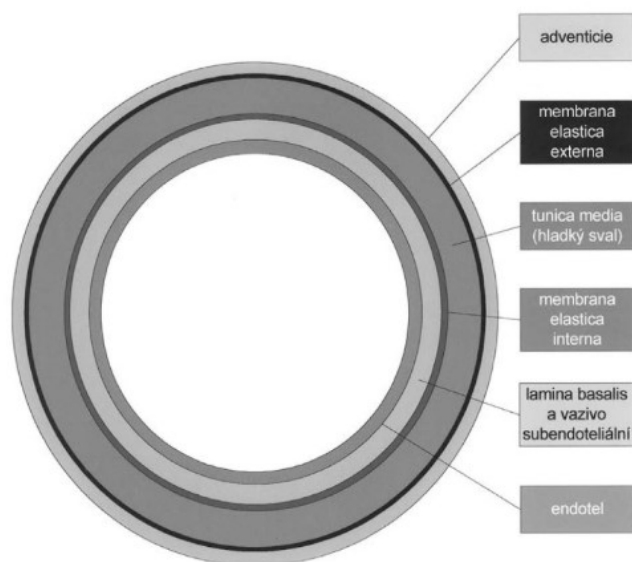
tudíž v některých případech nezbytná „okénka“ (*fenestrae*) která umožňují komunikaci s vnějším prostředím (*membranae fenestratae*). (Vajner et al. 2014, Mescher 2018)

Analogicky v arteriích střední vrstvu ohraničuje *membrana elastica externa*. (Vajner et al. 2014, Mescher 2018)

- **Tunica externa**

Zevní část cévy je tvořena adventicií. Adventicie je vazivová vrstva, která se skládá z kolagenních a elastických vláken a navazuje na vazivovou tkáň orgánů. (Mescher 2018)

Pozn.: Obecnou stavbu cév shrnuje Obr. 1.



Obr. 1 Obecná stavba cév (Převzato z: Trojan et al. 2003)

- **Vaskularizace cév**

Pokud není možná výživa ze samotného lumen, disponují větší cévy systémem vlastních cév (*vasae vasorum*). Mohou pronikat až do *tunica media* (Vajner et al. 2014). Vzhledem k tomu, že ve venózní krvi je znatelně nižší koncentrace kyslíku, nacházíme *vasa vasorum* spíše ve stěnách žil (Trojan et al. 2003).

- **Inervace cév**

V cévách, které obsahují ve vyšší míře hladké svalstvo, nacházíme vyvinutou síť nervových vláken. Arterie mají nervová zakončení zpravidla ve střední vrstvě, u žil se

nacházejí spíše v adventicii a je jich, v porovnání s arteriemi, podstatně méně. (Mescher 2018)

Sympatický nervový systém cévu kontrahuje, parasympatikus vyvolává vazodilataci. Na specifických místech cév jsou umístěny senzorické útvary. (Čihák 1997)

- **Mízní systém cév**

Specifické postavení má v anatomii kardiovaskulárního systému lymfatický systém. Je nutný proto, aby plazma vytvářející tekuté prostředí v intersticiu, byla vrácena zpět do systému. Tekutina ztracená mikrocirkulací se nesmí v tkáních hromadit, aby nedošlo k zástavě oběhu. Dále mízní systém plní transportní funkci pro látky s větší molekulovou hmotností (například pro lipidy z trávicího systému), odvádí odpadní produkty metabolismu a pomocí leukocytů v lymfě plní funkci obrannou. (Dylevský 2011)

Lymfatický systém je tvořen mízními cévami (*vasa lymphatica*), které ústí do velkých cév u srdce, samotnou mizou (*lymfa*) a mízními uzlinami (*nodi lymphatici*). (Čihák 1997)

V arteriích nacházíme lymfatické kapiláry v adventicii, ve vénách mízní systém vniká hlouběji do středních vrstev. (Vajner et al. 2014)

3.2.2 Funkční klasifikace cév

Krevní cévy podléhají základní klasifikaci na artérie, kapiláry a vény (Vajner et al. 2014). Díky vysokotlakému systému arterií se zajišťuje rychlá makrocirkulace systému. Nejmenší kapiláry zabezpečují výměnu látek mezi krví a cílovými tkáněmi a vény vedou odkysličenou krev zpět k srdci. (Trojan et al. 2003)

Dle funkce rozlišujeme (klasifikace dle Trojan et al. 2003):

- **Pružňkové cévy**

Jedná se o elastické tepny o průsvitu větším než 10 mm (Mescher 2018). Díky velkému množství glykoproteinů a glykosaminoglykanů ve střední vrstvě tunica media získávají tyto arterie vysokou pružnost a elasticitu, aby mohly rytmické pulzy krve přeměnit na kontinuální proudění. Mají poměrně málo buněk hladké svaloviny. (Trojan et al. 2003)

- **Odporové cévy**

Mezi odporové cévy patří jak arterioly (prekapilární rezistenční cévy), tak venuly (postkapilární rezistenční cévy). Mají vysoký podíl hladké svaloviny, a tak svou vazokonstrikcí či vazodilatací regulují distribuci krve v cílových tkáních. Venuly navíc zajišťují i kapilární filtraci a resorpci vlivem rozdílného hydrostatického tlaku mezi tepénkami a žilkami. (Trojan et al. 2003)

- **Prekapilární sfinktery**

Prekapilární sfinktery jsou koncové úseky prekapilárních arteriol. Různý průměr průsvitu svěrače rozhoduje o finálním počtu otevřených kapilár v určitém okamžiku, a tím se reguluje i velikosti kapilární plochy. (Celková kapilární plocha v lidském těle tvoří až 5000 m² (Mescher 2018).) Krev totiž nikdy neprotéká všemi kapilárami současně; v určitém čase je činná asi jedna čtvrtina kapilár (Trojan et al. 2003). Sfinktery rytmicky kontrahují rychlostí 5 pulsů na minutu, tím dochází k pulsaci krve v cílových tkáních (Mescher 2018).

- **Kapiláry**

Kapiláry jsou nejmenší (průměr v rozmezí 5-20 μm) a zároveň nejdůležitější součástí kardiovaskulárního systému (90 % cév jsou kapiláry) (Mescher 2018). Spojují arterioly a venuly. V kapilárách se ale hlavně odehrává výměna látek mezi krví a intersticiem. Jsou tvořeny pouze jednou vrstvou endotelu. Jejich vlastní schopnost kontrakce je limitována pouze na případně přítomné pericyty. (Trojan et al. 2003)

Pericyty zastávají i jiné funkce. Například při poškození kapilár pericity proliferují a diferencují se v další buňky, aby znovuobnovily mikrocirkulaci. (Mescher 2018)

Kapiláry, dle uspořádání buněk endotelu, mohou být souvislé, fenestrované nebo sinusoidní. (Martínek a Vacek 2009)

- **Kapacitní cévy**

Kapacitní cévy vytvářejí žilní systém organismu, který funguje jako rezervoár krve. Tunica media je oproti artériím méně vyvinutá. Díky velkému množství kolagenních i elastických vláken v adventicii, se mohou žíly náležitě roztáhnout a pojmout tak značný objem krve. (Mescher 2018)

- **Arteriovenózní zkratky**

Arteriovenózní zkratky zajišťují v některých tkáních v případě nutnosti rychlý převod krve z tepen do žil bez přítomnosti kapilár. (Trojan et al. 2003)

3.2.3 Histologie aorty

Arterie klasifikujeme na elastické a svalové. Aorta patří mezi arterie elastického typu, což znamená, že disponuje velice silnou tunicou medií, ve které se střídají fenestrované vrstvy elastických membrán a buňky hladké svaloviny. To je nutné pro vlastní pružnickový efekt. V aortě zdravého dospělého člověka je asi 50 vrstev těchto elastických blán. Při onemocnění oběhové soustavy (hypertenze) počet těchto membrán stoupá. (Mescher 2018)

Tunica intima je též velice vyvinutá, v subendotelu je mnoho hladkosvalových buněk. Chlopně (duplikátory intimy) zabraňují zpětnému toku krve do srdce. (Mescher 2018)

V tunica adventicia se nachází různé senzorké útvary, které monitorují prostředí. Jedná se o baroreceptory (tlak), chemoreceptory (koncentrace CO₂, O₂, pH). Získané informace se pomocí aferentních drah dostávají do CNS. (Mescher 2018)

3.3 Hladký cévní sval

Hladký cévní sval je jedním ze tří typů svaloviny. Svalstvo totiž klasifikujeme na myokard, příčně pruhované kosterní svalstvo a hladkou orgánovou svalovinu. (Silbernagel a Despopoulos 2004)

Jedná se o svalovinu, která má odlišnou morfologii, nemá příčné pruhování, není ovladatelná vůlí. (Dylevský 2009)

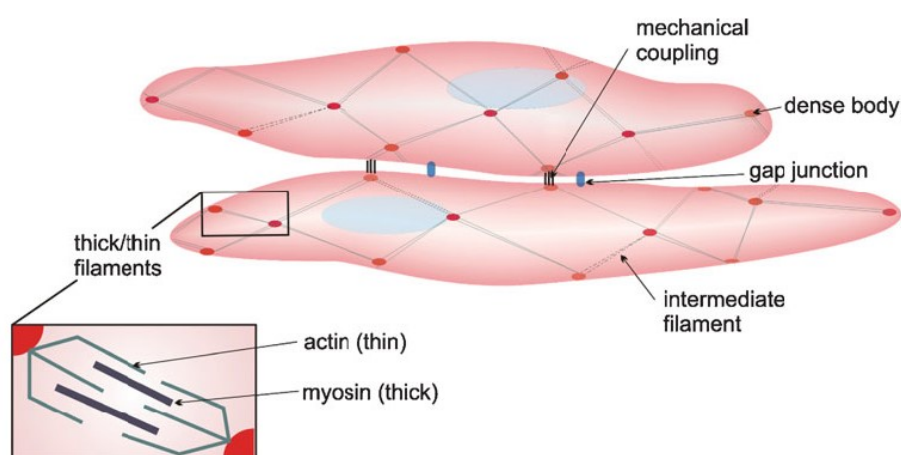
3.3.1 Charakteristika

Základním stavebním kamenem je myocyt. Myocyt je jednojaderná buňka charakteristického tvaru protáhlého vřetena. V cytoplazmě hladkosvalové buňky se nachází smrštitelné myofibrily (s kontraktálními bílkoviny aktinem a myozinem), ovšem oproti příčně pruhovanému svalstvu vykazují odlišnou stavbu a způsob kontraktility. (Dylevský 2009, Silbernagel a Despopoulos 2004)

Hlavní odlišností je organizace jednotlivých sarkomer. Zatímco sarkomery příčně pruhovaného svalstva jsou řádně uspořádány a vytváří tak charakteristický vzhled,

mikrofilamenta hladkého svalu vytvářejí neuspořádanou síť. Lehká vlákna (aktin, tropomyozin) jsou ukotvena pomocí denzních tělísek. Denzní tělíska se po okrajích myocytu, váží na vnitřní stranu plasmatické membrány (sarkolemy) a navíc jsou navzájem provázána desminem, což umožňuje přenos síly. Desmin je jeden z klíčových proteinů tvořící skelet buňky, propojuje mezi sebou myofibrily. (Paulin a Li 2004)

Odlišná je i kvantita myofibril. Myozinu je v hladkosvalové buňce třikrát méně, aktinu dvakrát více. Zmíněná neuspořádanost a odlišné množství filament má vliv na kontraktilní rozpětí hladkého svalu. Lehká vlákna neobsahují troponin, funkci regulačního proteinu zastává kalmodulin. (Viz Obr. 2) (Betts et al. 2017, Trojan et al. 2003)



Obr. 2 Struktura hladkého (útrobního) svalu (Převzato z: MacIntyre et al. 2007)

3.3.2 Klasifikace

Existují dva typy hladkého svalu: útrobní (orgánový) hladký sval a vícejednotkový (cévní) hladký sval. (Trojan et al. 2003)

- **Útrobní hladký sval**

Útrobní hladký sval v děloze, trávicím traktu, žlučových cestách, orgánech vylučovací soustavy nebo kůži. Je propojen buněčnými můstky (gap junctions) a vytváří tak mnohojaderný buněčný útvar (syncytium). Vlivem tohoto uspořádání a také díky vlastní pacemakerové aktivitě (spontánní depolarizaci) buněk, se vzruch snadněji tvoří a šíří. Útrobní hladký sval má svoji jistou autonomní aktivitu, kontrakce je možná i bez nervového či humorálního stimulu. Po působení mechanických podnětů (napínání), nebo tepelných či humorálních stimulů, se může jevit rytmická kontrakce. (Betts et al. 2017, Trojan et al. 2003)

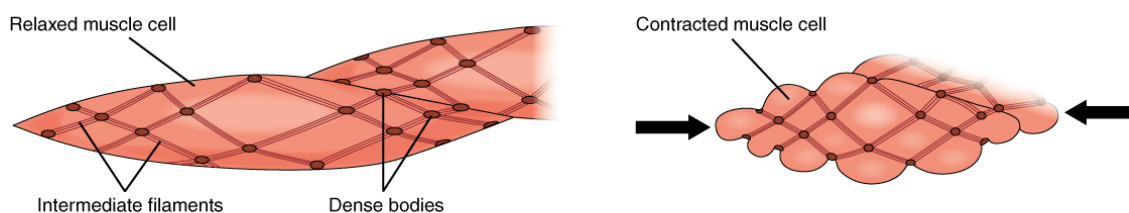
- **Vícejednotkový hladký sval**

Vícejednotkový hladký sval syncytium pomocí můstků nevytváří. Svalové jednotky pracují nezávisle. Více reagují na podněty autonomního nervového systému (velké množství varikozit) a na humorální stimuly. Tento typ hladkého cévního svalstva lze najít zejména ve velkých cévách, kde reguluje vaskulární odpor, nebo u svalu oka, kde je nutný jemný přesný pohyb. (Betts et al. 2017, Trojan et al. 2003)

3.4 Mechanismus kontrakce cév

Při stahu cév hraje ústřední roli vápník, stejně jako u kontrakcí ostatních typů muskulatury. Stah začíná influxem extracelulárních iontů kalcia skrze L-typ vápníkových kanálů, které jsou zakotveny v sarkolemě. Vzhledem k tomu, že myocyt disponuje pouze primitivně vyvinutým sarkoplasmatickým retikulem (oproti kosternímu svalu), intracelulární příspěvek kalcia je minimální. (Betts et al. 2017)

Jak již bylo výše zmíněno, svalová vlákna hladkého cévního svalu neobsahují troponiny. Vápenaté ionty se tedy váží na kalmodulin. Vzniklý komplex aktivuje lehkoreťezcovou myozinovou kinázu (MLCK). MLCK fosforyluje hlavy myozinových řetězců. Dojde ke spojení aktivního místa aktinu s myozinovou hlavou, následné konformační změně části myozinu a k tahu tenkých vláken. Nastává kontrakce. Díky nepravidelnému upořádání intrafilament, která jsou spojena se sarkolemou, se kontrahuje celé svalové vlákno, ať už začíná kontrakce odkudkoliv. Poklesem koncentrace kalcia uvnitř buňky se aktivuje enzym lehkoreťezcová myozinová fosfatáza a dochází k defosforylaci aktinu. Zanikají můstky mezi lehkými a těžkými filenty a hladký sval relaxuje. (Viz Obr. 3) (Fontana a Maďa 2014, Betts et al. 2017)



Obr. 3 Způsob kontrakce hladkého svalu (Převzato z: Betts et al. 2017)

3.5 Regulace krevního tlaku

Krevní tlak je jedním ze základních faktorů zajišťující homeostázu organismu. Zabezpečuje perfuzi tkání (Trojan et al. 2003). Krevní tlak (KT) udává, jakou silou působí krev na cévní stěnu (Mladěnka 2014).

Regulace oběhu krve se odehrává na dvou úrovních. Rozlišujeme centrální a místní řízení periferní cirkulace. (Trojan et al. 2003)

a) Centrální regulační mechanismy

Centrální regulační mechanismy zajišťují stálý tok krve i přesto, že se neustále mění prokrvení jednotlivých tkání. Vazomotorické centrum v prodloužené míše a reakce autonomního nervového systému (především sympatiku) dle potřeby mění činnosti srdce a vazomotoriku cév, aby byl udržen konstantní arteriální tlak krve, její objem a aby byla umožněna distribuce do aktuálních míst potřeby. (Trojan et al. 2003)

b) Místní regulační mechanismy

Oproti tomu místní regulační mechanismy zaručují dostatečnou perfuzi tkání dle aktuálních nároků konkrétního orgánu. (Trojan et al. 2003)

3.6 Místní regulační mechanismy

Je nezbytné, aby byly splněny tři základní požadavky. Musí zajistit stálý průtok krve tkání i při změně tlaku krve, dále udržovat konstantní lineární rychlost průtoku krve a ovlivňovat perfuzi tkání dle aktuálních metabolických nároků (stimuly jsou například změněné koncentrace O₂, CO₂, kyseliny mléčné apod.) (Trojan et al. 2003)

3.6.1 Endotelové působky

Z hemodynamicky působících látek, které endotel produkuje, budou v následujících kapitolách zmíněny: NO, prostanoidy a endotelin.

- **Oxid dusnatý (NO)**

Oxid dusnatý, dříve známý pod zkratkou EDRF (endothel derived relaxing factor), je vůbec nejdůležitější působek, který endotel produkuje. Podílí se na regulaci bazálního tonu cév i na regulaci cévního odporu. (Púzserová et al. 2008)

NO vzniká z aminokyseliny L-argininu pomocí specifické endotelové NO-syntázy (eNOS) za přítomnosti dalších kofaktorů. NO-syntáza je aktivována řadou signálních molekul (bradykinin, adenosin, acetylcholin, substance P, serotonin, VEGF, ...). Ovšem NO může vzniknout i na popud mechanického namáhání (smykové napětí krevního proudu). (Deanfield et al. 2007, Púzserová et al. 2008)

V případě, že v cévě je nárazově zvýšena lineární rychlost toku krve, projeví se vazodilatační účinek NO. (Trojan et al. 2003)

NO difunduje do buněk hladkého svalstva cév, aktivuje guanylátcyklázu, což vede k tvorbě cyklického 3,5-guanozin monofosfátu (cGMP) (Deanfield et al. 2007). Cyklický GMP aktivuje cGMP-dependentní proteinkinázu, což vede ke snížení intrabuněčné koncentrace vápenatých iontů a k defosforylaci myozinu. Nastává kýžená relaxace. (Púzserová et al. 2008)

Oxidem dusnatým indukovaná vazodilatace je ale možná i jinou cestou, která je na cGMP nezávislá. NO aktivuje draslíkové kanály, dochází k hyperpolarizaci membrány a následné relaxaci. (Púzserová et al. 2008)

NO má i jiné než vazodilatační účinky. Působí i antitromboticky, antiaterogenně, a protizánětlivě. (Trojan et al. 2003)

Silných vazodilatačních efektů NO jsme využívali při našich experimentech, kdy jsme chtěli navodit 100 % relaxaci. K těmto účelům jsme využívali nejsilnější antihypertenzivum – nitroprusid sodný. (Viz kap. 5. 2. 3)

Vazodilatačních účinků NO se používá i v běžné praxi. Nitráty dilatují koronární tepny, snížením tlaku se snižuje i napětí a tím pádem i spotřeba kyslíku. Jsou indikovány hlavně u ICHS a hypertenze. (Vítovec a Špínar 2004)

- **Prostaglandiny**

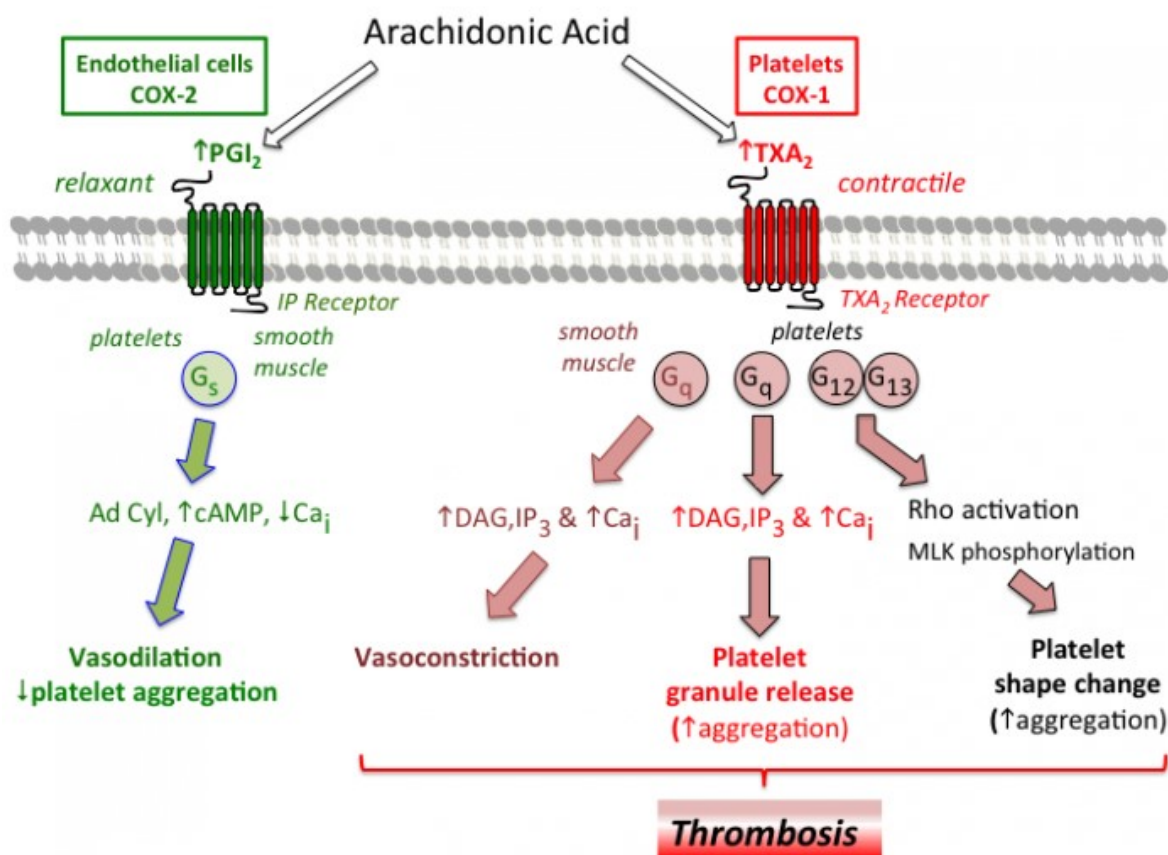
Dalšími vazodilatačními působky endotelu jsou prostaglandiny.

Obecně se jedná o prostanoidy. Jsou to tkáňové hormony, které ve vaskulárním systému vznikají z arachidonové kyseliny působením konstitutivní COX-1 nebo indukovatelné COX-2. (Viz Obr. 4) (Silbernagel a Despopoulos 2004)

Endotel tvoří PGI₂ (prostacyklin) a PGE₂ (prostaglandin-E₂) (Sawyer 2001). Nejúčinnější PGE₂ má navíc i inotropní účinky (Kittnar et al. 2011).

Jejich vazodilatační potenciál se projevuje zejména až při vysokých ztrátách krve. Prostaglandiny lokálně syntetizovány v ledvinách, tlumí vazokonstrikční působení

katecholaminů a angiotenzinu II (AT₂), a tím tak brání ischemickému poškození ledvin. (Kittnar et al. 2011)



Obr. 4 Syntéza prostanoidů (Převzato z: TMedWeb 2017)

Pozn.: Na obrázku je vidět i syntéza tromboxanu-A₂ (TXA₂) za účasti COX-1, který je ovšem tvořen krevními destičkami, nikoliv endotelem. TXA₂ má naopak vazokonstrikční účinky a stimuluje agregaci destiček. (Bijak a Saluk-Bijak 2017)

• Endoteliny

Endoteliny jsou peptidy vyvolávající vazokonstrikci. Významu nabývá především endotelin-1 (ET₁). Kromě konstrikčních, proliferačních a trombotizujících účinků, způsobuje zvýšenou stažlivost myokardu a zrychluje rytmus srdečních frekvencí. (Trojan et al. 2003)

Nadprodukce endotelinu je jedním z klíčových faktorů ve vývoji aterosklerózy a dalších kardiovaskulárních onemocnění. (Corder et al. 2001)

3.6.2 Hormonálně-neurogenní mediátory

- **Katecholaminy**

Noradrenalin (norepinefrin), adrenalin (epinefrin) a dopamin jsou souhrnně označovány jako katecholaminy. Tyto endogenní biogenní aminy, jsou tělu vlastní hormony a neurotransmitery (Doležal et al. 2016). Chemicky se jedná o deriváty pyrokatecholu (odtud vyplývá název) (Duncan a Sourkes 1978).

Syntetizují se z aminokyseliny tyrozinu ve dřeni nadledvin, v menší míře ve varikozitách sympatického nervstva (Silbernagel a Despopoulos 2004).

Činnost hladkého svalstva cév řídí autonomní nervový systém (ANS) (Trojan et al. 2003).

ANS se skládá ze dvou základních jednotek: sympatického a parasympatického nervového systému. Při regulaci vazomotoriky cév jsou jednoznačně nejdůležitějšími hormony neuromediátory sympatiku adrenalin (A) a noradrenalin (NA). (Silbernagel a Despopoulos 2004)

O tom, jaká bude v cévách finální odpověď na A a NA, rozhodují přítomné adrenergní receptory. Pro hladké svalstvo cév nabývají významu zejména podtypy α_1 a β_2 . Receptory α_1 nalezneme ve většině cév hladké svaloviny, β_2 receptory převažují v koronárních cévách a cévách kosterního svalstva. Stimulace α_1 receptorů vede k vazokonstrikci cév, naopak stimulace β_2 vyvolá (až na výjimku erektilní tkáně) relaxaci. Receptory jsou relativně selektivní. Alfa receptory jsou více citlivé na noradrenalin, beta receptory mají větší afinitu k adrenalinu. (Kittnar et al. 2011)

Účinky:

Adrenalin působí na všechny adrenergní receptory, přičemž vyšší afinitu má k typům beta. Při vyplavení adrenalinu tedy dochází k dominantní vazodilataci cév v srdci a kosterní svalovině (β_2 stimulace) a zároveň k vazokonstrikci cév vnitřních orgánů a kůže (α_1 stimulace). Adrenalin tak touto redistribucí krve připraví organismus na svalovou práci – boj. Zároveň stimuluje skrze β_1 receptory srdce ke zvýšení minutového srdečního objemu. Výsledný krevní tlak se proto příliš nemění. (Trojan et al. 2003)

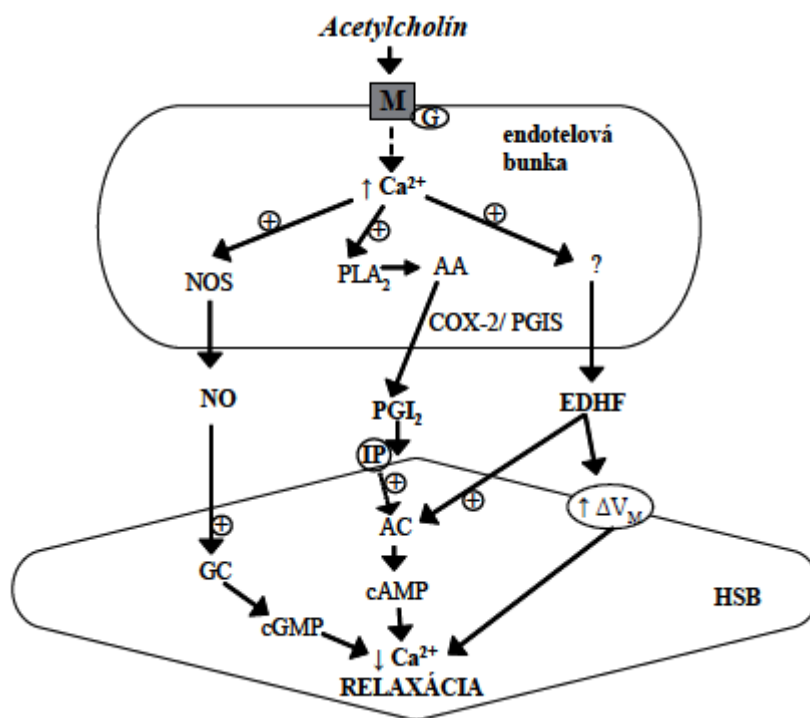
Oproti adrenalinu NA v běžné dávce na β_2 receptory nepůsobí. To má v cévním systému pouze jeden následek. Díky α_1 se cévy kontrahují, zvýší se periferní odpor a tím pádem i krevní tlak. (Trojan et al. 2003)

- **Acetylcholin**

Acetylcholin je klíčový neurotransmitter. Přenáší totiž vzruchy jak v CNS, tak i v ANS. V rámci ANS se vyskytuje ve všech pregangliových nervových zakončení, u parasympatiku působí i v postgangliových vláknech. (Silbernagel a Despopoulos 2004)

Rozlišujeme dva typy receptorů pro acetylcholin – nikotinové a muskarinové. Endotelové buňky disponují muskarinovými M3 receptory, ovšem cévy nemají svou přirozenou parasympatickou inervaci a nedochází ke stimulaci parasympatiku v pravém slova smyslu. (Silbernagel a Despopoulos 2004)

Acetylcholin v tomto případě figuruje jako spouštěč vazodilatační kaskády. Metabotropní M3 receptor sprážený s G-proteinem, po stimulaci acetylcholinem, aktivuje (skrze fosfolipázu C) druhého posla inositoltrifosfát (IP₃). IP₃ se naváže na vápníkový kanál endoplazmatického retikula a nastane influx vápenatých iontů do cytosolu. (Pro pokračování procesu viz kap. 3.6.1) (Viz Obr. 5) (Alberts et al. 2005)



Obr. 5 Acetylcholin jako spouštěč relaxace v hladkosvalových buňkách závislých na působcích endotelu (Převzato z: Púzserová et al. 2008)

3.6.3 Enzymatická regulace

- **Renin-angiotensin-aldosteronový systém**

Renin je hormon s vlastnostmi enzymu. Do cirkulace se uvolňuje při hypotenzi ve *vas afferens*, při stimulaci β_1 -receptorů v juxtaglomerulárním aparátu a za nízkých koncentrací NaCl. Renin štěpí angiotenzinogen na angiotenzin I (AT_1). AT_1 je následně konvertován angiotenzinogen konvertujícím enzymem (ACE) na angiotenzin II. Uvolněný angiotenzin II má několik funkcí: silně kontrahuje cévy, zvyšuje tonus sympatiku a stimuluje sekreci aldosteronu z kůry nadledvin. (Silbernagel a Despopoulos 2004, Trojan et al. 2003)

- **Kininový systém**

Proteáza kallikrein (obsažena ve slinách a potu) působením na plazmatické bílkoviny produkuje bradykinin. Bradykinin vede k lokálně zvýšené propustnosti cévní stěny a k vazodilataci. Tento systém se uplatňuje ve žlázách gastrointestinálního traktu a v potních žlázách. (Trojan et al. 2003)

3.6.4 Ostatní

Mezi další působky, které mají vliv na tonus hladkého svalstva cév, řadíme i serotonin, antidiuretický hormon (ADH), natriuretické peptidy a histamin. (Silbernagel a Despopoulos 2004, Trojan et al. 2003)

3.7 Celkové regulační mechanismy

Celkové regulační mechanismy zodpovídají za integritu oběhového systému (Souček 2009).

Z časového hlediska můžeme úrovně kontroly klasifikovat na rychlé, střednědobé a dlouhodobé. (Viz Obr. 6) (Souček 2009)

- **Rychlé**

Téměř okamžitá reakce na změny KT je zprostředkována baroreceptory. Tyto mechanoreceptory nacházíme zejména v *arcus aortae*, v karotickém sinu, ale i v plicních arteriích ap. Baroreceptory vedou informaci o cévním napětí do vazomotorického centra mozkového kmene, kde se informace zpracuje. V případě vysokého KT dojde k inhibici sympatiku a aktivaci parasympatiku. Sníží se minutový srdeční výdej a periferní odpor.

Krevní tlak se opět normalizuje. Pokud je tlak krve nízký, účinky jsou opačné. (Kittnar a Mlček 2009)

Obdobně funguje regulace pomocí chemoreceptorů. (Trojan et al. 2003)

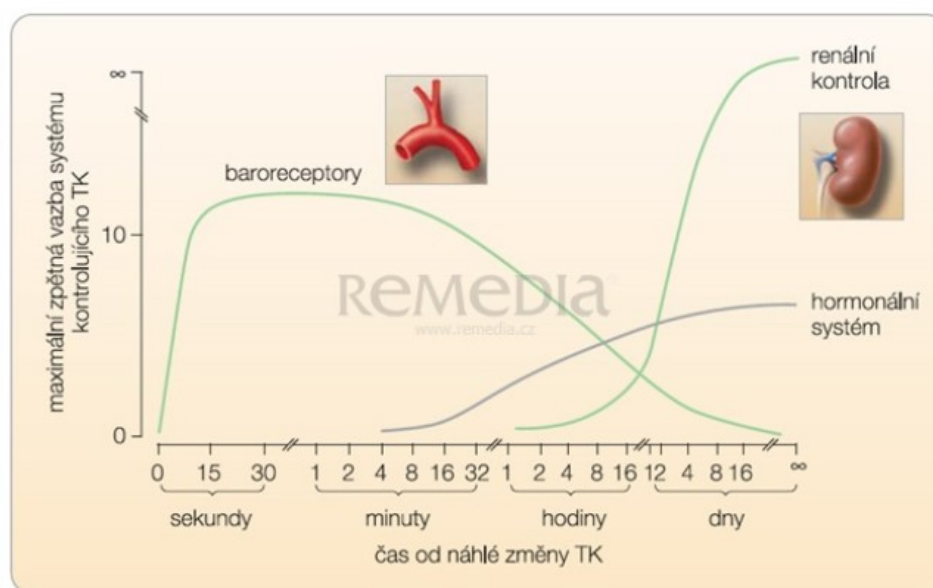
- **Střednědobé**

Střednědobá regulace je zprostředkována pomocí hormonů: vasopresinu, angiotenzinu II a kortizolu. Tyto látky primárně pomáhají udržet objem krve, samy o sobě ale mají i vazokonstrikční efekt. (Rokyta 2015). Můžeme sem zařadit i řízení tonu pod vlivem adrenalinu a noradrenalinu. (Viz kap. 3.6.2)

- **Dlouhodobé**

Na pomezí střednědobých a dlouhodobých mechanismů regulace je systém RAAS. Plně aktivní systém je už po 20 minutách po spuštění, ale jeho účinky (zvýšení krevního volumu) dlouho přetrvávají. (Trojan et al. 2003)

Nepochybně sem patří systém tlakové natriurézy v ledvinách, také vazopresin a natriuretický faktor. (Rokyta 2015)



Obr. 6 Mechanismy regulující krevní tlak (Převzato z: Souček 2009)

3.8 Flavonoidy

Flavonoidy jsou nejčastěji se vyskytující fenolické sloučeniny v říši rostlin (Kumar a Pandey 2013). Je známo více než 4000 konkrétních látek (Spilková 2016).

Flavonoidy mají pozitivní pleiotropní účinky, jsou proto nezbytnou složkou v lidské potravě, i v potravě zvířat. Rostliny jsou totiž jediné organismy, které umí flavonoidy syntetizovat. (Ovšem u některých bakterií a hub byly rozpoznány geny pro biosyntézu flavonoidů.) (Kumar a Pandey 2013)

Nalezneme je v ovoci, zelenině, cereáliích, ořechách, luštěninách i v oblíbených nápojích jako je zelený čaj, kakao nebo víno. Množství, a tedy i následný účinek flavonoidů v konkrétním jídle a nápojích se ovšem značně liší. (Bravo 1998)

Z chemického hlediska jsou flavonoidy fenolické sloučeniny hydroxylované na specifických místech. Jejich aktivita je podmíněna strukturou chemického skeletu, stupněm hydroxylace, přítomností dalších substituentů a stupněm polymerizace. (Kumar a Pandey 2013)

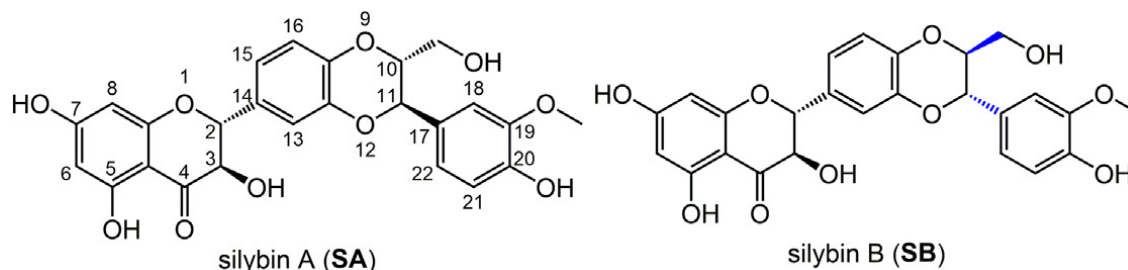
Dle polohy hydroxylů na pyranovém kruhu, můžeme flavonoidy rozdělit na: flavony, flavanoly, dihydroflavanoly, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly, chalkony a aurony. (Spilková 2016)

V rostlinách jsou syntetizovány zejména na popud mikrobiálních infekcí, ale hrají roli i v sekundárních antioxidačních obranných mechanismech v případě, že jsou rostliny vystaveny stresu jakéhokoli původu (biotický, abiotický stres) (Kumar a Pandey 2013). Obecně lze říci, že se flavonoidy účastní oxidačních a redukčních reakcí, působí jako silné antioxidanty (Spilková 2016, Rahimi et al. 2018).

3.8.1 Silymarin

Silymarin je flavolignan izolovaný z nažek ostropestřce mariánského (*Silybum marianum*) (Spilková 2016). Chemicky se jedná o adiční sloučeninu flavanolu (taxifolinu) a koniferylalkoholu (prekurzoru lignanu) (Tůmová et al. 2006).

Silymarin se skládá ze tří flavolignanů: silybinu, silykristinu a silydianinu (Tůmová et al. 2006). Za hlavní účinnou látku se považuje silybin, který je obsažen v silymarinovém komplexu v největší míře (cca 30 %) a snadno se izoluje. Silybin je racemická směs silybinu-A a silybinu-B. (Viz Obr. 7) (Tvrdý et al. 2018)



Obr. 7 Stereoizomery silybinu (Převzato z Tvrký et al. 2018)

Silymarin na buněčné úrovni ovlivňuje propustnost buněčných membrán, inhibuje tvorbu leukotrienů, vycytává volné kyslíkové radikály, má schopnost chelatace kovů a snižuje aktivitu transkripčních faktorů NF- κ B, proteinkináz a tvorbu kolagenu. (Kumar a Pandey 2013, Gabrielová et al. 2019)

Silymarin tedy působí jako hepatoprotektivum (léčba jaterní cirhózy, ischemické poškození jater), stimuluje regeneraci jaterního parenchymu. Dokáže odvrátit toxické poškození jater způsobené vysokými dávkami paracetamolu, amanitinu, faloidinu i dalších toxinů. Silymarinový komplex má i antioxidantní účinky, působí jako choleretikum a slabé spasmolytikum. (Kumar a Pandey 2013, Spilková 2016)

Byly pozorovány i kardioprotektivní a antidiabetické účinky, založené na schopnosti antioxidantce (Rahimi et al. 2018).

Konkrétně 2,3-dehydrosilybin je schopen omezit rozsah infarktu myokardu a urychlit regeneraci ischemicky poškozených tkání potkanů. To je zřejmě dáno jeho antioxidantní aktivitou a také tím, že pozitivně ovlivňuje mechanismy závislé na buněčné signalizaci skrze Src-kinázy. (Gabrielová et al. 2019)

Silymarin by také mohl snižovat kardiovaskulární riziko tím, že může fungovat jako COX inhibitor. Snižuje tak riziko trombózy, a tudíž i riziko výskytu kardiovaskulárních příhod. Zvláště silybin a silykristin mají potenciál se vázat na aktivní formy COX. Při inhibici COX-2 snižují agregaci krevních destiček, z inhibice i COX-1 vychází protizánětlivé působení. (Bijak a Saluk-Bijak 2017)

4 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je ověřit potenciální vazodilatační účinky několika látek silymarinového komplexu: silybinu-A, silybinu-B, silybinu-A+B a isosilybinu-A:

- Na izolované a prekontrahované aortě potkana *ex vivo* změřit vazorelaxační účinky kumulativně podávané testované látky nebo směsi.
- Na základě získaných údajů spočítat procentuální hodnoty relaxace oproti maximální možné, sestrojít příslušné DRC křivky a určit hodnoty EC_{50} .
- Porovnat zjištěné hodnoty EC_{50} .

5 Experimentální část

5.1 Potřebné materiální vybavení, pokusná zvířata

5.1.1 Chemikálie

Během experimentu jsme využívali soli pro vytvoření Krebsova roztoku (viz Tab. 2, Tab. 4), vazoaktivní látky (fenylefrin, acetylcholin, nitroprusid sodný; viz Tab. 2), potenciálně vazoaktivní flavolignany (silybin-A, silybin-B, silybin-A+B, isosilybin A; viz Tab. 3) a ostatní pomocné látky (dimetylsulfoxid, uretan, destilovaná voda; viz Tab. 2)

Tab. 2 Identifikace použitých chemikálií

Název látky	Vzorec	Mr [g/mol]	Původ
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	KH_2PO_4	136,09	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česká republika
Chlorid sodný p.a.	NaCl	58,44	Penta Chrudim, Česká republika
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	CaCl_2	110,99	Lachema Brno, Česká republika
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	NaHCO_3	84,01	Penta Chrudim, Česká republika
Chlorid draselný p.a.	KCl	74,56	Lachema Brno, Česká republika
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,47	Lachema Brno, Česká republika
D-glukóza monohydrát p.a.	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$	180,16	Penta Chrudim, Česká republika
Fenylefrin hydrochlorid p.a.	$\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl}$	203,67	Sigma-Aldrich, Německo
Acetylcholin jodid p.a.	$(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{I})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$	273,1	Sigma-Aldrich, Německo
Nitroprusid sodný dihydrát p.a.	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	297,95	Sigma-Aldrich, Německo
Dimetylsulfoxid (DMSO)	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	78,13	Sigma-Aldrich, Německo

Uretan	C ₃ H ₇ NO ₂	89,09	Sigma-Aldrich, Německo
Destilovaná voda	H ₂ O	18,02	Katedra biochemických věd, FaF UK HK, dle platného lékopisu

5.1.2 Testované látky

Tab. 3 Potenciálně vazoaktivní flavolignany

Název látky	Struktura	Původ
Silybin-A		Doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D.; Akademie věd České republiky, Praha
Silybin-B		Doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D.; Akademie věd České republiky, Praha
Silybin-A+B		Doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D.; Akademie věd České republiky, Praha
Isosilybin-A		Doc. Ing. Kateřina Valentová, Ph.D.; Akademie věd České republiky, Praha

Pozn.: Pro všechny látky platí Mr = 482,44 g/mol.

Obrázky struktur převzaty z: Sigma-Aldrich 2019

5.1.3 Krebsův roztok

Jako živné médium byl zvolen Krebsův roztok, protože nejlépe mimikuje vnitřní prostředí lidského těla (pH Krebsova živného roztoku je 7,4, podobně jako je tomu v lidské plazmě). Všechny soli (viz Tab. 4) se naváží a postupně rozpustí v destilované vodě. Chlorid vápenatý se nechá rozpustit až jako poslední, aby se předcházelo vzniku sraženin (málo rozpustných vápenatých solí). Poté se doplní objem destilovanou vodou na požadované množství.

Tab. 4 Složení Krebsova roztoku

Název látky	Koncentrace [g/l]
Chlorid sodný p.a.	5,54
Chlorid draselný p.a.	0,35
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	0,28
Hydrogenuhlíčitan sodný p.a.	2,1
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	0,16
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	0,29
D-glukóza monohydrát p.a.	2,1

5.1.4 Pokusná zvířata

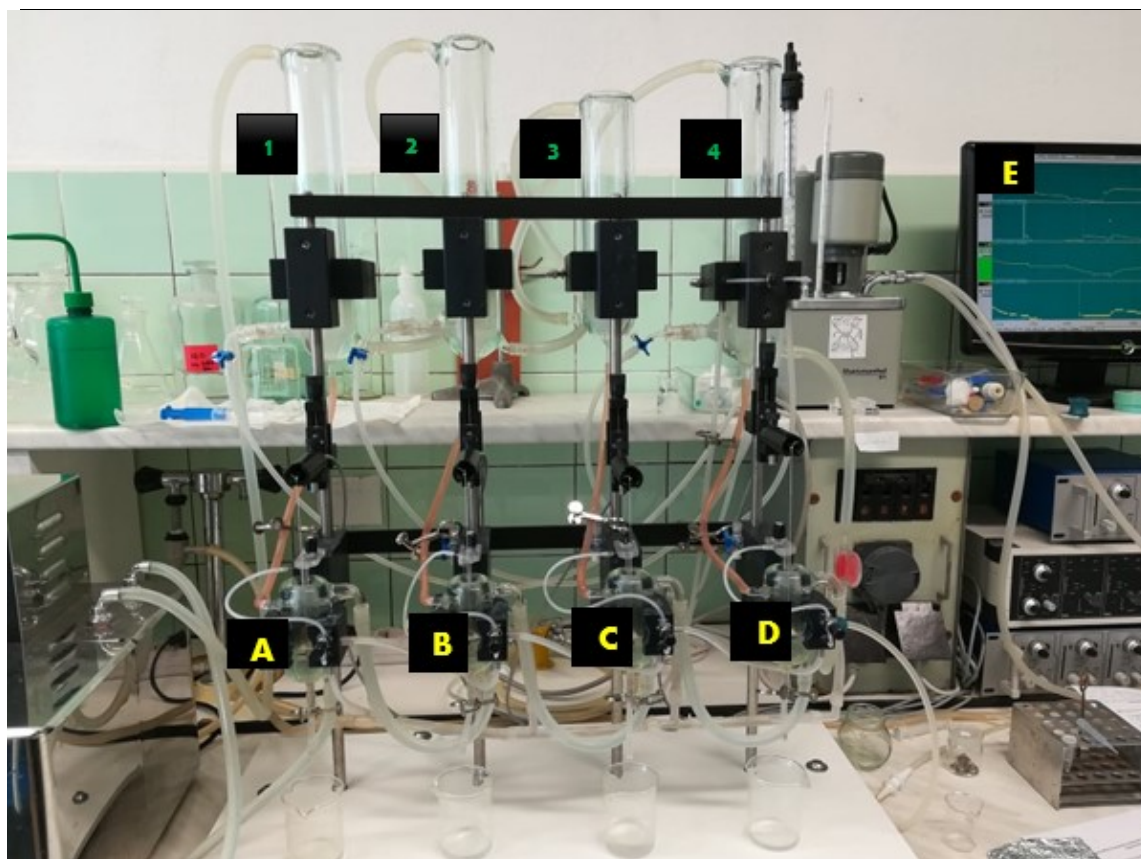
Experiment byl prováděn na outbredním kmeni laboratorních potkanů Wistar. Jednalo se o samce o hmotnosti 300 – 400g, kteří byli minimálně týden aklimatizováni ve viváriu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Za laboratorní teploty byli potkani krmeni standartní peletizovanou potravou, s volným přístupem k pitné vodě. Potkany fakultnímu viváriu dodala firma Charles River z Německa.

Pokusy probíhaly dle zákona č. 246/1992 Sb., tedy dle zákona České národní rady na ochranu zvířat proti týrání a byly schváleny Etickou komisí Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

5.1.5 Přístrojové vybavení

Tab. 5 Přístrojové vybavení

Přístroj	Výrobní firma	Stát
Aparatura pro izolovanou tkáň ex vivo (Multi chambre tissue bath system) (viz Obr. 8)	Experimentia Ltd.	Maďarsko
Vyhodnocovací software (S.P.E.L., Advanced Kymograph Software SOFT -03-KYMO)	Experimentia Ltd.	Maďarsko
Třepačka (IKA Vortex Genius 3)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Německo
Laboratorní váhy	Kern & Sohn GmbH	Německo



Obr. 8 Aparatura pro izolovanou tkáň ex vivo v laboratoři katedry farmakologie a toxikologie FaF UK
A, B, C, D: Lázně s háčky, na kterých jsou zachyceny vzorky cév. Lázně mimikují homeostatické prostředí.

E: Počítač s vyhodnocovacím softwarem zaznamenávající hodnoty.

1,2,3,4: Zásobníky s Krebsovým roztokem

(Zdroj: Osobní archiv)

5.1.6 Ostatní

- Plynová lahev s pneumoxidem (směs 95 % O₂ a 5 % CO₂)
 - Výroba: Linde gas, Česká republika
- Laboratorní nádobí (sklo, lžička, mikropipety, Petriho misky, kádinky)
- Operační nástroje (operační stolek, peán, nůžky, pinzety, injekční stříkačky, jehly)
- Software GraphPad Prism, verze 6

5.2 Metodika práce

5.2.1 Příprava

- **Izolace aorty potkana**

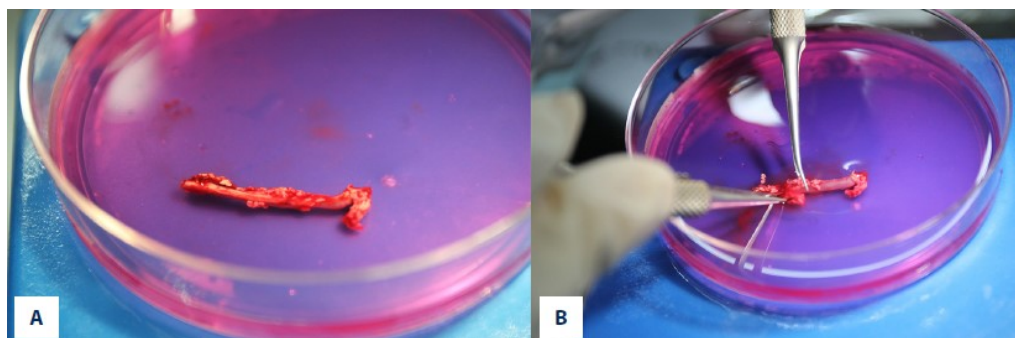
Samec potkana byl 24 hodin před experimentem odstaven od příjmu potravy. Poté je uveden do celkové anestezie pomocí intraperitoneálního podání uretanu v minimální dávce 1,2 g/kg. Do injekční stříkačky s ostrou jehlou, se natáhne anestetický roztok uretanu s koncentrací 20 g/100 ml. Požadovaný objem se vypočítá dle hmotnosti potkana (viz Tab. 6).

Tab. 6 Objem roztoku uretanu dle hmotnosti

Hmotnost potkana [g]	200	225	250	275	300	325	350	375
Objem anestetika [ml]	1,2	1,35	1,5	1,65	1,8	1,95	2,1	2,25

Na abdominální straně se provede sagitální řez a zpřístupní se břišní dutina. Smrt potkana nastává v důsledku ztráty krve odběrem jehlou z břišní aorty, krev je využita pro další výzkumné účely. Po vykrvení se otevře hrudník. Šetrně se vyjme hrudní část aorty, která je okamžitě vložena do připravené Petriho misky s Krebsovým roztokem.

Aorta se nejprve zbaví okolní tkáně. Poté se nastříhá na cca 3-4 mm dlouhé úseky. Je nutné postupovat opatrně, aby se neobratnou manipulací neporušil endotel (viz Obr. 9).



Obr. 9 Preparace aorty (Převzato z: Jufang et al. 2017)

Jednotlivé segmenty aorty jsou instalovány do aparatury. Háček aparatury spojený nitkou je připojen k převodníku, který převádí mechanickou energii (vazomotorické pohyby cév) na elektrické signály. Elektronické informace o aktuální zátěži cévy jsou zaznamenávány do počítače pomocí softwaru *S.P.E.L. Advanced Kymograph Software*. Aortální kroužky se nasadí na háčky a ponoří se do 5 ml Krebsova roztoku. Pro udržení homeostatického prostředí je živný roztok aparaturou temperován na teplotu těla, tedy na 37°C. Aby bylo zajištěno okysličení cév, je do Krebsova živného roztoku přiváděna směs kyslíku (95%) a oxidu uhličitého (5%).

- **Stabilizace a zátěž tkáně**

Vzorky tkáně se zatíží na 2 g a jsou stabilizovány po dobu 45 minut. Každých 10 minut je vyměněn Krebsův roztok. Po posledním výplachu se ponechá aktuální zátěž.

- **Testování kontraktility a funkce endotelu**

Nejprve se, pro navození kontrakce, do lázně s Krebsovým roztokem přidá 50 μl noradrenalinu o koncentraci 10^{-4} M, což navodí konečnou koncentraci v lázni 10^{-6} M. Po stabilizaci hodnot se přidá 50 μl acetylcholinu o koncentraci 10^{-3} M (pro konečnou koncentraci v lázni 10^{-5} M). Pokud po podání acetylcholinu dojde k vazodilataci, je endotel neporušen (viz kap. 3. 6. 2. Acetylcholin). Po tomto testu se ještě několikrát cévy promyjí Krebsovým roztokem pro úplné odstranění noradrenalinu a acetylcholinu. Po ustálení hodnot může začít vlastní experiment.

5.2.2 Vlastní experiment

Aby se projevily případné vazodilatační účinky testovaných látek, musí se céva opět prekontrahovat. Do lázně s aortou se proto přidalo 50 μ l fenylefrinu o koncentraci 10^{-3} M, pro konečnou koncentraci v lázni 10^{-5} M. Po ustálení kontrakce se následně kumulativně přidávají připravené roztoky testovaných látek se vzrůstající koncentrací. Nová dávka se přidává vždy až po stabilizaci odpovědi na dávku předchozí. Koncentrace silybinů v lázni stoupají od 10^{-7} M až po 10^{-4} M. Hodnoty se průběžně zaznamenávají. Během jednoho experimentu se testují tři segmenty aorty, čtvrtá je použita jako kontrola. Do kontrolní lázně se přidává tedy pouze vehikulum (DMSO bez flavonoidů) o stejné koncentraci.

5.2.3 Ukončení experimentu

Pro ukončení experimentu se do lázně přidá nitroprusid sodný s konečnou koncentrací 10^{-5} M, který navodí kompletní relaxaci. (Viz kap. 3. 6. 1 Oxid dusnatý (NO))

5.2.4 Vyhodnocení výsledků

Zaznamenané hodnoty se zpracují nejprve pomocí programu Excel, který přepočítá hodnoty zátěže navozené dílčími koncentracemi na procenta z maximální relaxace. Získané údaje se následně pomocí programu GraphPad Prisma vynesou do grafu. Na ose x jsou uvedeny jednotlivé koncentrace testovaného flavonoidu (logaritmické měřítko), na ose y je procento relaxace aorty. Poté se sestrojí relaxační křivka a určí koncentrace, která vyvolá 50% maximální relaxace (EC_{50}). Pro zhotovené křivky a pro hodnoty EC_{50} je určen konfidenční interval 95%.

6 Výsledky

Látky byly aplikovány na aortální segmenty prekontrahované fenylefrinem. Všechny aortální kroužky měly intaktní endotel, což bylo potvrzeno vazodilatačním působením acetylcholinu na prekontrahovanou cévu noradrenalinem.

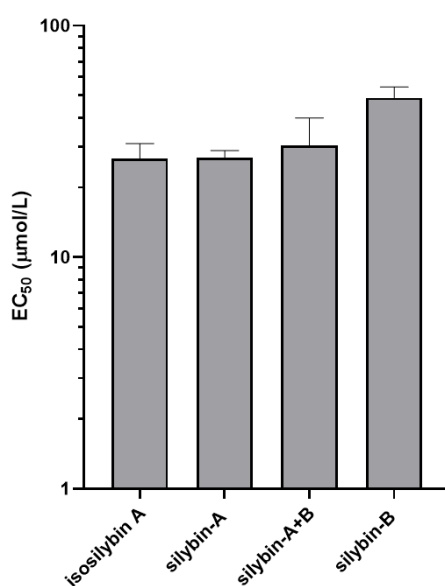
Testované substance silymarinového komplexu byly postupně kumulativně přidávány do lázně. Jejich koncentrace v lázni nabývaly hodnot 10^{-7} až 10^{-4} M.

Všechny testované substance navodily vazodilataci hrudní aorty potkana závislou na dávce. Žádnou z látek ale nebyla dosažena 100% relaxace. (Za 100% koncentraci je považována dilatace navozena nitroglycerinem.)

Vazorelaxační schopnost jednotlivých látek shrnuje tabulka a graf zobrazující hodnoty EC_{50} (viz Tab. 7, Obr. 10). Relaxační křivky jsou uvedeny v příloze práce (viz Příloha 1, 2, 3, 4).

Tab. 7 Hodnoty EC_{50} testovaných látek včetně konfidenčního intervalu

Název látky	EC_{50} [μ M]	Konfidenční interval 95%
Silybin-A	26,8	24,87 - 28,92
Silybin-B	48,8	43,91 - 54,31
Silybin-A+B	30,3	23,40 - 39,97
Isosilybin-A	26,7	23,04 - 30,95



Obr. 10 Hodnoty EC_{50} testovaných látek včetně střední chyby průměru (SEM)

7 Diskuze

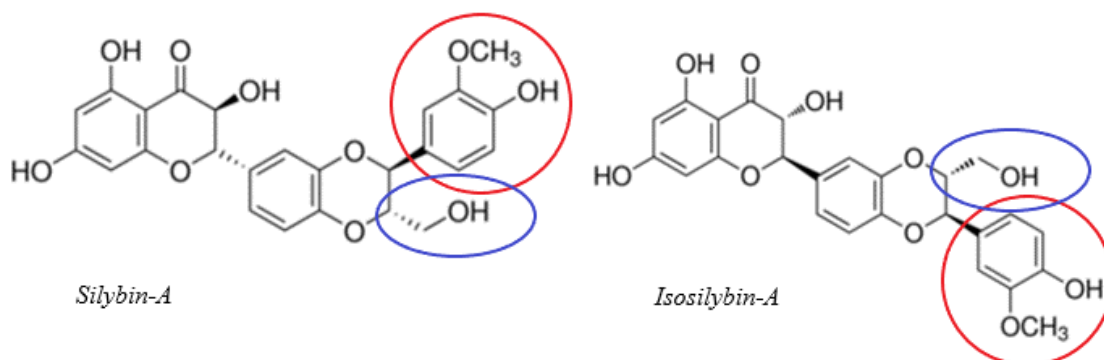
Ostropestřec mariánský se užívá jako tradiční rostlinný léčivý přípravek již od nepaměti jako hepatoprotektivum (Ross 2008). Lékopisná droga vykazuje ale i další pleiotropní účinky jako jsou: kardiovaskulární protekce, ochrana ledvin, hypolipidemická aktivita, antiaterogenní potenciál, prevence inzulinové rezistence, Alzheimerovy choroby nebo rakoviny (Bahmani et al. 2015).

Katedra farmakologie a toxikologie se mimo jiné zajímá o kardiovaskulární účinky fenolických sloučenin, respektive o abilitu flavonoidních látek dilatovat cévy. Tato práce navazuje na předchozí pokusy výzkumné skupiny Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie. Cílem mé diplomové práce bylo ověřit vazorelaxační účinky několika látek ze silymarinového komplexu.

Výhodou bylo, že jsme měli k dispozici čisté látky, které nám poskytla Akademie věd České republiky. Vzhledem k tomu, že substance byly syntetizovány *de novo*, a nikoliv izolovány přímo z drogy ostropestřce, jejich účinky by měly být jednoznačnější, což je žádoucí i pro případnou reprodukovatelnost výsledků. (Biedermann et al. 2014)

Co se vazodilatační účinnosti látek týče můžeme dle schopnosti relaxace descendentně seřadit látky následovně: isosilybin-A ~ silybin-A > silybin-A+B > silybin-B. (Pozn.: pro struktury jednotlivých látek viz Tab. 3)

Rozdíly mezi účinky isosilybinu-A a silybinu-A jsou minimální. V prostředí biologických pokusů s vysokým množstvím a variabilitou podmínek, které mohou experiment ovlivňovat, lze účinky isosilybinu-A a silybinu-A považovat téměř za totožné. Lze tedy konstatovat, že výměna substituentů v polohách 10 a 11 u silybinu-A a jeho isoformy podstatně neovlivňuje účinnost.



Obr. 11 Poloha substituentů látek silybinu-A a isosilybinu-A

Pozn: Struktury převzaty ze Sigma-Aldrich 2019

Naprosto významný je rozdíl účinnosti mezi silybinem-A a silybinem-B. V klinicky dosažitelných koncentracích silybin-B téměř kopíruje DRC křivku DMSO, můžeme ho proto považovat za prakticky neúčinný. Silybin-A a silybin-B jsou stereoizomery. I když mechanismus vazodilatačního účinku není zatím znám, můžeme jejich rozdílnou účinnost připisovat jinému prostorovému uspořádání.

V rámci experimentu jsme také testovali směs silybinu-A a silybinu-B (Silybin-A+B). Vycházeli jsme ze skutečnosti, že v ostropestřci se nachází směs látek, které mohou navzájem svou účinnost ovlivňovat. Při srovnání hodnot EC_{50} vidíme, že se hodnota EC_{50} silybinu-A+B pohybuje mezi S-A a S-B. Proto se nezdá, že by se účinky silybinu-A a silybinu-B vzájemně potencovaly nebo inhibovaly. Jinak by tomu mohlo ale být v případě podání silymarinového komplexu, ve kterém jsou obsaženy i další látky. V tomto případě tedy možnost potenciace účinku nelze vyloučit. Pro ověření této hypotézy by bylo potřeba provést další pokusy.

Jak konkrétně vyvolávají silymariny své účinky není ještě známo. V úvahu však přicházejí následující teorie.

Jedním z možných mechanismů účinku by mohla být vazodilatace zprostředkovaná endotelem. Klíčový mediátor je v tomto případě NO, tedy působek zdravých endotelových buněk, vznikající z L-argininu pomocí eNO-syntázy.

Roli by mohl hrát i sympatický nebo parasympatický receptorový systém. Během experimentu jsme využívali noradrenalin, případně fenylefrin, jako α_1 -sympatomimetika. Za předpokladu, že stimulace α_1 -receptorů způsobila vazokonstrikci a aplikované silymariny následně cévu relaxují, silymarinové flavonolignany by mohly účinkovat jako antagonisté α_1 -receptorů.

Silymariny by teoreticky mohly interferovat i s parasympatickým systémem. Muskarinové receptory M_3 v cévách reagují na uvolněný acetylcholin a spustí se kaskáda. Endotelové buňky začnou produkovat NO, PGI, EDHF, což má za následek vazodilataci cévy.

Z dlouhodobého hlediska by mohly silymariny zabránit zmenšování průsvitu cév svojí schopností eliminovat volné kyslíkové radikály. Předchází tak peroxidaci lipidů, poškození endotelu a dalším komplikacím vycházejících z nežádoucích oxidačních procesů. (Bahmani et al. 2015, Kim a Je 2017, Rahimi et al. 2018) Tento typ účinků ale není pravděpodobný při akutním působení, které jsme používali během našich pokusů.

Abychom mohli lépe porozumět této problematice a získané výsledky v budoucnu využít pro testy *in vivo*, mohl by se výzkum věnovat dalším oblastem jako například:

- Provést testy s dalšími kombinacemi látek silymarinového komplexu, aby výzkumy mohly odrážet realitu působení komplexu jako celku.
- Zjistit konkrétní mechanismy účinku jednotlivých látek silymarinového komplexu, např. objasnit závislost na endotelu či vliv na iontové kanály.
- Zjistit bližší informace o konjugátech silymarinů (s kyselinou glukuronovou, nebo sulfáty), což by reflektovalo reálné chování silymarinů *in vivo*. Výzkumy naznačují, že právě konjugáty by se mohly významně podílet na účinku silymarinu. Silymariny se na ně rychle po podání metabolizují, podstupují významný enterohepatální oběh a tím si zvyšují svou biodostupnost a eliminační poločas. (Wen et al. 2008)

8 Závěr

Tato diplomové práce se zabývá vazodilatačními účinky vybraných látek silymarinového komplexu: silybinu-A, silybinu-B, silybinu-A+B a isosilybinu-A.

Jejich potenciální vazodilatační účinky jsme ověřovali *in vitro* na hrudních aortách potkanů kmene Wistar.

Z provedených experimentů vyplývají následující závěry:

- Vazodilatační schopnost silybinu-A a jeho strukturního izomeru isosilybinu-A je srovnatelná. Zdá se, že poloha substituentů nemá na vazodilatační účinek vliv.
- Silybin-B je, oproti jeho stereoizomeru silybinu-A, v klinicky dosažitelných koncentracích v podstatě neúčinný. Mechanismus navození relaxace cév by mohl být stereoselektivní.
- Vazodilatační působení ekvimolární směsi silybinu-A a silybinu-B naznačuje, že tyto látky navzájem neinhibují ani nepotencují své účinky.
- Vazodilatační potenciál klesá v řadě: isosilybin-A ~ silybin-A > silybin-A+B > silybin-B.

9 Literatura

1. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Rooberts K, Walter P. Základy buňčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky. Ústí nad Labem: Espero, 2005: 740. ISBN 80-902906-2-0
2. Andreas M, a kol. Compendium: Léčiva používaná v podmínkách ČR. 5. vyd. Praha: Panax, 2018: 1200. ISBN 978-80-902806-7-0
3. Bahmani M, Shirzad H, Rafieian S, Rafieian-Kopaei M. Silybum marianum: Beyond Hepatoprotection. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2015; 20(4): 292-301. DOI:10.1177/2156587215571116
4. Betts JG, et al. *Anatomy and Physiology*. Houston: Openstax 2017: 1420.
5. Biedermann D, Vavrikova E, Cvak L, Kren V. Chemistry of silybin. *Nat. Prod. Rep.* 2014; 31: 1138–1157. DOI: 10.1039/c3np70122k
6. Bijak M, Saluk-Bijak. Flavonolignans inhibit the arachidonic acid pathway in blood platelets. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017; 17: 396.
7. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*; 1998; 56(11): 317-333.
8. Cífková R, Škodová Z, Lánská V, Adámková V, Novozámská E, Jozífová M, Plášková M, Hejl Z, Petržílková Z, Galovcová M, Palouš D. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech Republic. Results of two nationwide cross-sectional surveys in 1997/1998 and 2000/2001, Czech Post-MONICA Study. *Journal of Human Hypertension*; 2004; 18: 571–579.
9. Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 2001; 414(6866): 863–864. DOI: 10.1038/414863a.

10. Čihák R. Anatomie 3. 1. vyd. Praha: Grada, 1997: 672. ISBN 80-7169-140-2
11. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation* 2007; 115: 1285-1295. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859
12. Doležal M, a kol. Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém. Praha: Karolinum, 2016: 132. ISBN 978-80-246-3460-9
13. Duncan RJS, Sourkes TL. Enzymes Involved in Catecholamine Metabolism: Tyrosine Hydroxylase, Aromatic Amino Acid Decarboxylase, Dopamine β -Hydroxylase, Phenylethanolamine N-Methyltransferase, Catechol O-Methyltransferase, Aldehyde Dehydrogenase, and Alcohol Dehydrogenase. *Research Methods in Neurochemistry* 1978: 145-175.
14. a) Dylevský I. Funkční anatomie. Praha: Grada, 2009:544. ISBN 978-80-247-7030-7
15. b) Dylevský I. Základy funkční anatomie. Olomouc: Poznání, 2011:332. ISBN 978-80-87419-06-9
16. Gabrielová E, Bartošiková L, Nečas J, Modrianský M. Cardioprotective effect of 2,3-dehydrosilybin preconditioning in isolated rat heart. *Fitoterapia* 2019; 132: 12–21. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.10.028>
17. Chambers CH. S, Holečková V, Petrásková L, Biedermann D, Valentová K, Buchta M, Křen V. The silymarin composition... and why does it matter? *Food Research International* 2017. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.017
18. Jufang, et al. Primary Culture of Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cells: A New Method. *Med Sci Monit* 2017; 23: 4014-4020. DOI: 10.12659/MSM.902816

19. Junqueira LCU, Carneiro J, Kelley RO. Základy histologie. 7. vyd. Jinočany: H&H 1997:502. ISBN 80-85787-37-7
20. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. Lancet; 2005; 365: 217–23.
21. Kim Y, Je Y. Flavonoid intake and mortality from cardiovascular disease and all causes: A meta-analysis of prospective cohort studies. Clinical Nutrition ESPEN 2017; e1-e10. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnesp.2017.03.004>
22. a) Kittnar O, a kol. Lékařská fyziologie. 1.vyd. Praha: Grada, 2011: 800. ISBN 978-80-247-3068-4
23. b) Kittnar O, Mlček M. Atlas fyziologických regulací. 1. vyd. Praha: Grada, 2009: 320. ISBN 978-80-2447-2722-6
24. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The ScientificWorld Journal; 2013: 1-16.
25. MacIntyre D, Smith R, Chan ECH. Myometrial activation - Coordination, connectivity and contractility. Fetal and Maternal Medicine Review 2007; 18(04): 333-356. DOI: 10.1017/S0965539507002033
26. Martínek J, Vacek Z. Histologický atlas. Praha: Grada 2009: 136. ISBN 978-80-247-2393-8
27. Mescher AL. Junqueirovy základy histologie. Praha: Galén, 2018: 558. ISBN 978-80-7492-324-1
28. Paulin D, Li Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. Experimental Cell Research 2004; 301:1– 7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.08.004>

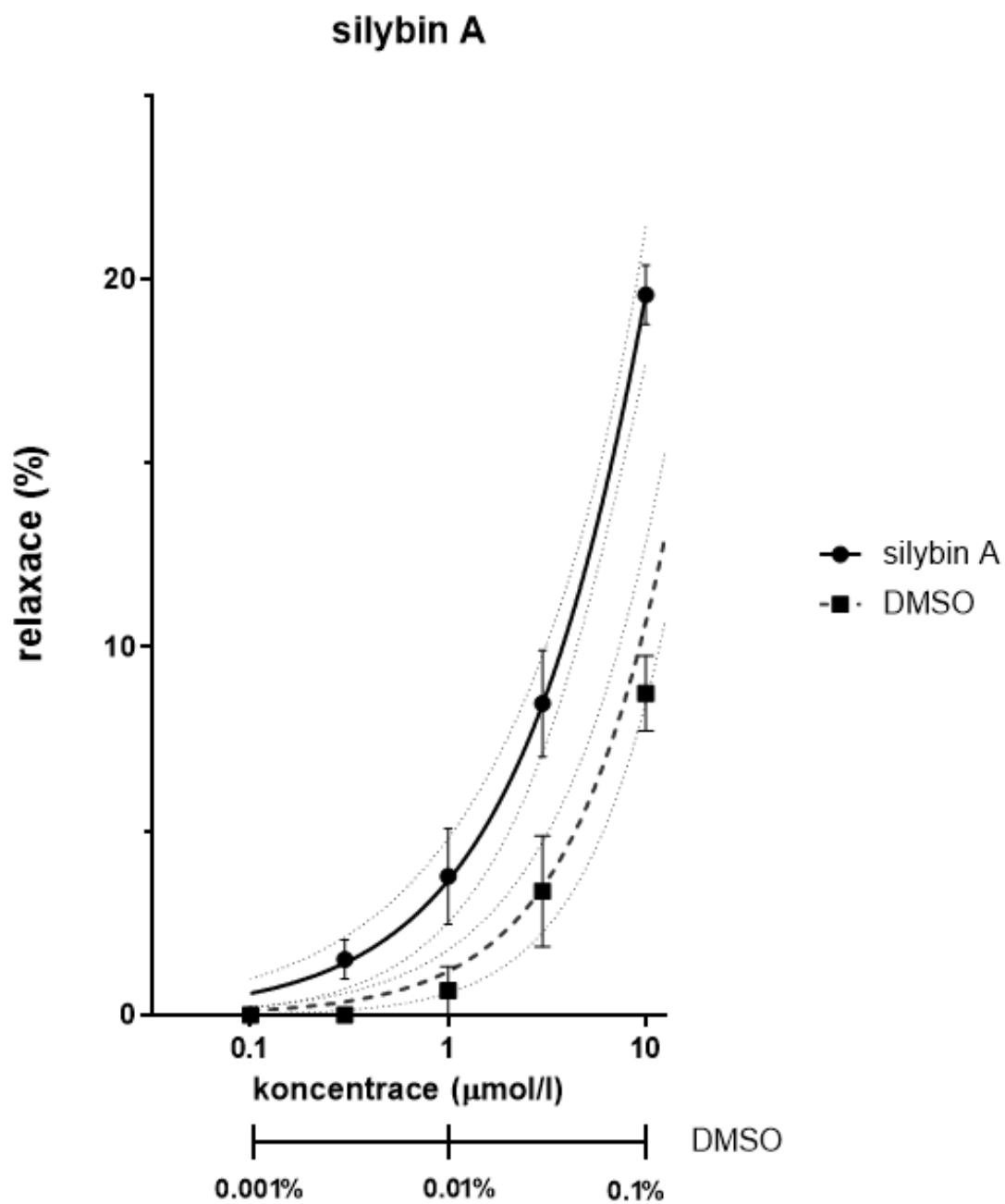
29. Púzserová A, Kopincová J, Bernátová I. The role of endothelium and nitric oxide in the regulation of vascular tone. *Československá fyziologie* 2008; 52: 2–3.
30. Rahimi R, Karimi J, Khodadadi I, Tayebinia H, Kheiripour N, Hashemnia M, Goli F. Silymarin ameliorates expression of urotensin II (U-II) and its receptor (UTR) and attenuates toxic oxidative stress in the heart of rats with type 2 Diabetes. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; 101: 244–250.
31. Rokyta R. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. 1.vyd. Praha: Grada, 2015: 712. ISBN 978-80-247-4867-2
32. Ross SM. Milk Thistle (*Silybum marianum*) An Ancient Botanical Medicine for Modern Times. *Holist Nurs Pract* 2008; 22(5): 299–300. DOI:10.1097/01.hnp.0000334924.77174.
33. Sawyer SJ, Norvell SM, Ponik SM, Pavalko FM. Regulation of PGE2 and PGI2 release from human umbilical vein endothelial cells by actin cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281: C1038–C1045. DOI:10.1152/ajpcell.2001.281.3.c1038
34. Silbernagel S, Despopoulos A. *Atlas Fyziologie člověka: 6. vydání, zcela přepracované, rozšířené*. 3. vyd. Praha: Grada, 2004: 448.
35. Silbernagl S, Lang F. *Atlas patofyziologie člověka*. 1.vyd. Praha: Grada, 2001:404. ISBN 80-7169-968-3
36. Souček M. Pozice blokátorů imidazolinových receptorů v léčbě hypertenze. *Remedia* 2009; 2: 153-157.
37. Spilková J. *Farmakognozie*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN 978-80-246-3264-3
38. Trojan S, a kol. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: Grada, 2003:772. ISBN 80-247-0512-5

39. Tůmová L, Řimáková J, Tůma J, Dušek J. Silybum marianum in vitro-flavonolignan production. *Plant soil environ.* 2006; 52(10): 454–458.
40. Tvrđý V, et al. Interaction of isolated silymarin flavonolignans with iron and copper. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2018; 189: 115–123.
41. Vajner L, Uhlík J, Novotný T, Konrádová V. *Lékařská histologie II.: Mikroskopická anatomie.* Praha: Karolinum 2014: 174.
42. Vítovec J, Špinar J et al. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění: druhé, přepracované a doplněné vydání.* Praha: Grada 2004: 248. ISBN 80-247-0866-3
43. Vlček J, Fialová D, a kol. *Klinická farmacie I. 1. vyd.* Praha: Grada, 2010. ISBN 978-80-247-3169-8
44. Vrablík M, Janotová M, Motyková E, Prusíková M. Endoteliální dysfunkce – první stadium aterosklerózy. *Med. Praxi.* 2011; 8(3): 119–122.
45. Wen Z, Dumas TE, Schreiber SJ, Hawke RL, Fried MW, Smith PC. Pharmacokinetics and Metabolic Profile of Free, Conjugated, and Total Silymarin Flavonolignans in Human Plasma after Oral Administration of Milk Thistle Extract. *Drug metabolism and disposition* 2008; 36(1): 65-72. DOI: 10.1124/dmd.107.017566.
46. Wen-Yi Li et al. Relative Bioavailability of Silybin A and Silybin B From 2 Multiconstituent Dietary Supplement Formulations Containing Milk Thistle Extract: A Single-dose Study. *Clin Ther.* 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2017.11.013>

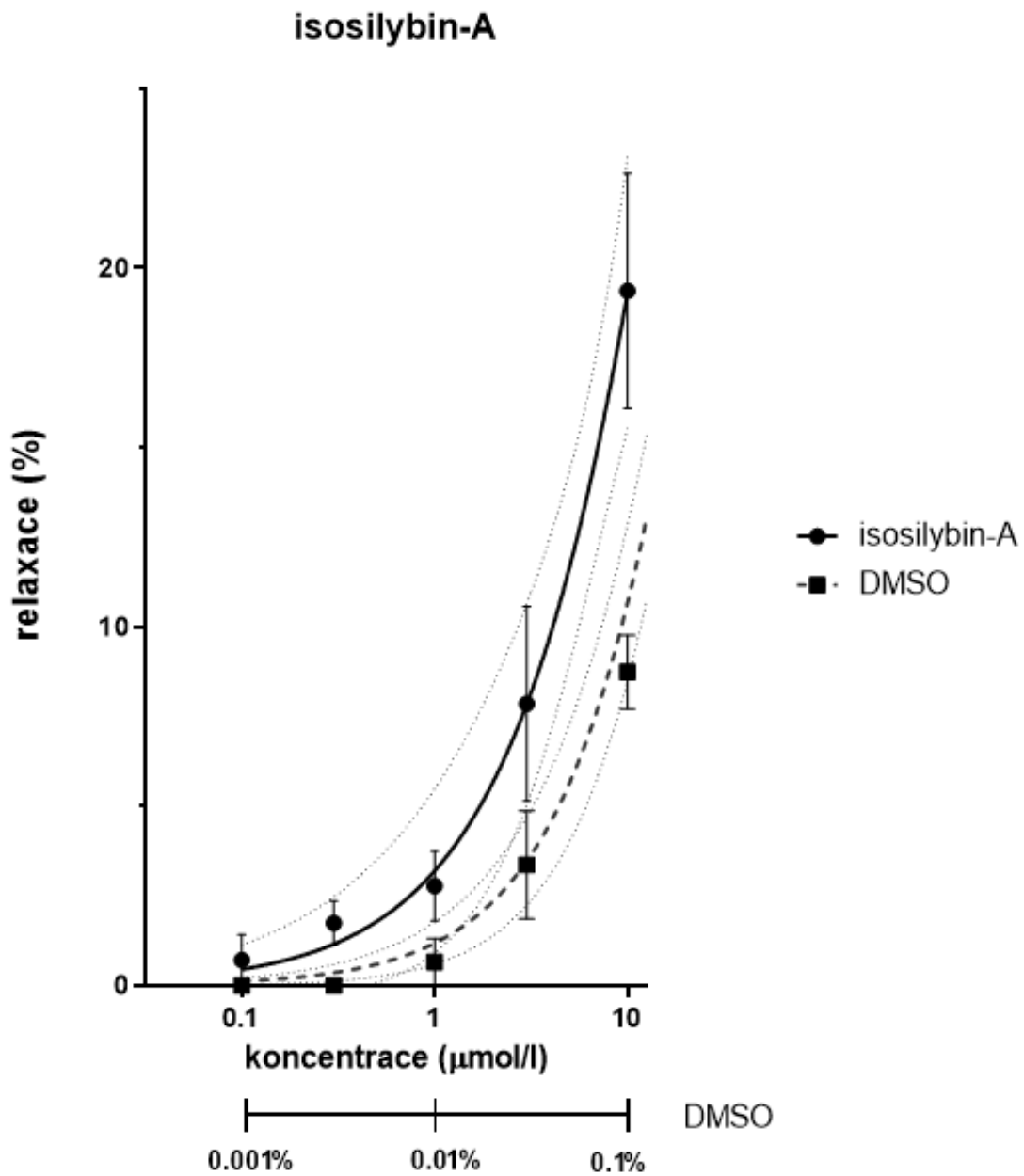
Elektronické zdroje:

1. Anonym. In:Sigma-Aldrich. Dostupné na URL: <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html> Přístup: 11. 4. 2019.
2. Anonym. Tulane University School of Medicine Medical Student Portal [online]. In: TMedWeb. 5.3.2017 11:27. Dostupné na URL: http://tmedweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/introduction_to_eicosanoids . Přístup: 27. 3. 2019 15:00.
3. Fontana J, Maďa P. Funkce buněk a lidského těla: Multimediální skripta se cvičebnicí. Praha: 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy: 627. 21.1. 2014 Dostupné na URL: <http://fbt.cz/skripta/iv-pohybova-soustava/6-svalova-kontrakce/> . Přístup 15.3. 2019.
4. Mladěnka P. Antihypertenziva. In: Faf.cuni.cz: studijní materiály farmakologie a toxikologie. 04.04.2014 Dostupné na URL: https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KFLT/?path=farmakologie+i+-+zimm%C3%AD+semestr%5cfarmakologie+i+-+dokumenty%5csp+farmacie_p%C5%99edn%C3%A1%C5%A1ky+farmakologie+i_texty&page=2 . Přístup: 25.3. 201

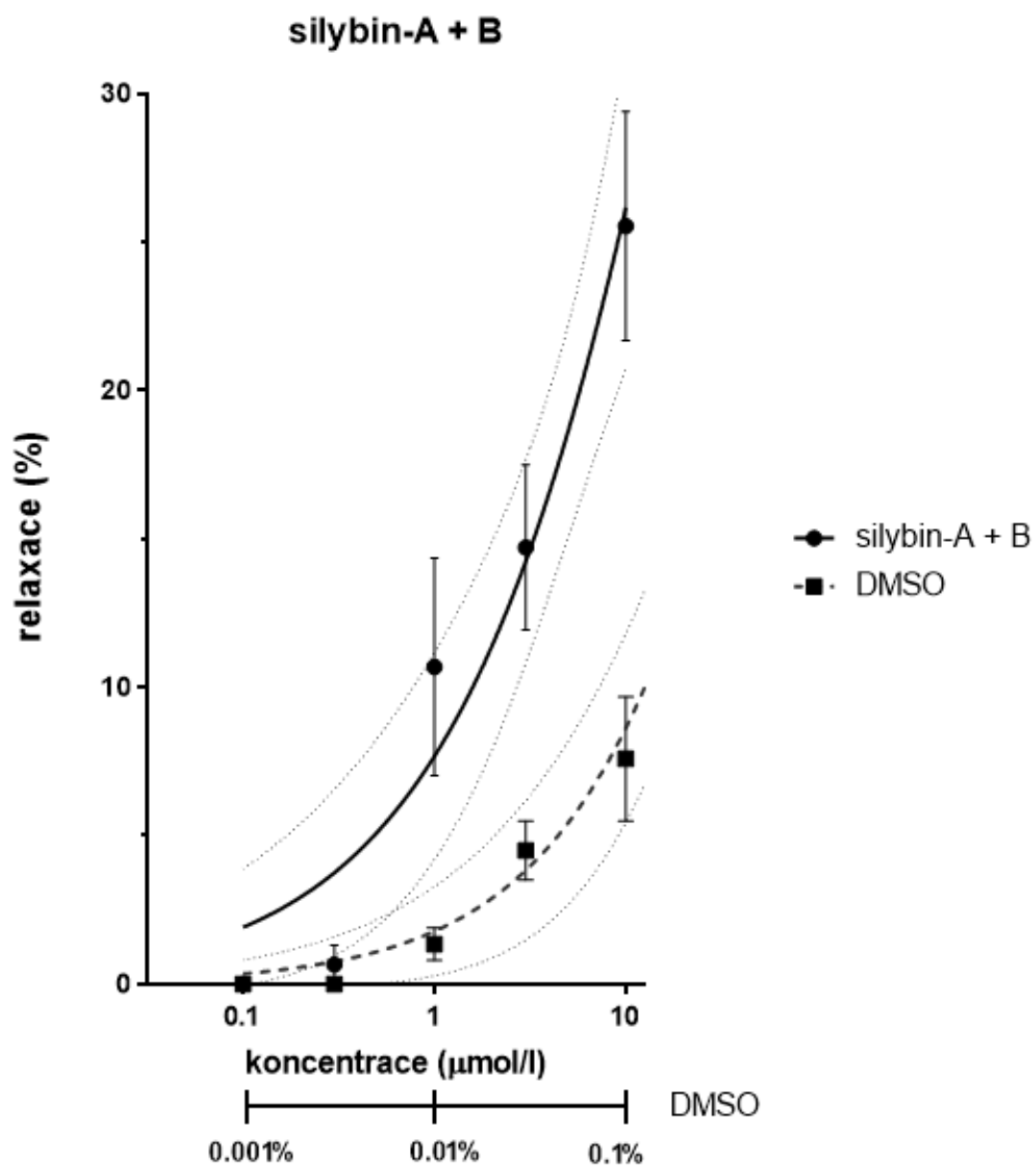
10 Přílohy



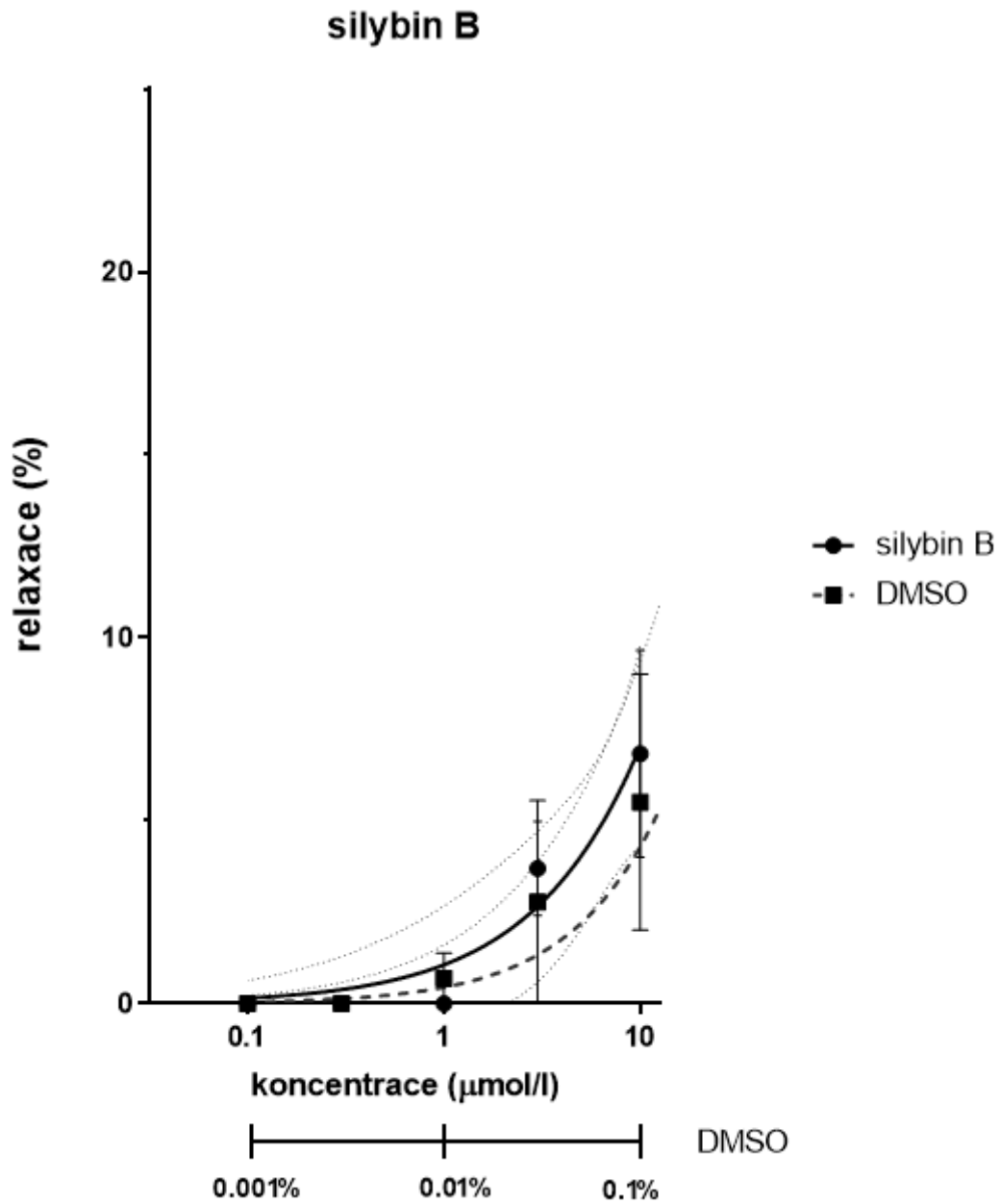
Příloha 1 DRC křivka popisuje vazodilatační účinek silybinu-A. Zachycuje závislost relaxace aorty potkana na koncentraci silybinu-A. Koncentrace DMSO, jakožto kontroly, je vyjádřena v procentech pod osou x.



Příloha 2 DRC křivka popisuje vazodilatační účinek isosilybinu-A. Zachycuje závislost relaxace aorty potkana na koncentraci isosilybinu-A. Koncentrace DMSO, jakožto kontroly, je vyjádřena v procentech pod osou x.



Příloha 3 DRC křivka popisuje vazodilatační účinek silybinu-A+B. Zachycuje závislost relaxace aorty potkana na koncentraci isosilybinu A. Koncentrace DMSO, jakožto kontroly, je vyjádřena v procentech pod osou x.



Příloha 4 DRC křivka popisuje vazodilatační účinek silybinu-B. Zachycuje závislost relaxace aorty potkana na koncentraci silybinu-B. Koncentrace DMSO, jakožto kontroly, je vyjádřena v procentech pod osou x.

