

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



Vliv polyfenolických látek na hladký cévní sval

The effect of polyphenolic substances on vascular smooth muscle

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí disertační práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Hradec Králové, 2017

Mgr. Iveta Najmanová

Prohlašuji, že disertační práci na téma Vliv polyfenolických látek na hladký cévní sval jsem vypracovala samostatně, pod vedením svého školitele doc. PharmDr. Přemysla Mladěny, Ph.D a své konzultantky PharmDr. Marie Vopršalové, CSc. Veškerá literatura, ze které jsem čerpala, je uvedena v seznamu použité literatury a je v práci řádně citována. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Disertační práce vznikla za podpory projektu na podporu excelence v základním výzkumu (GA ČR - P303/12/G163) a Univerzity Karlovy (253115 C, SVV 260 293, Univerzitní výzkumné centrum UNCE 204019/304019/2012).

V Hradci Králové

.....

Mgr. Iveta Najmanová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. a své konzultantce PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za odborné vedení i přátelský přístup, a také za trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu mého studia věnovali. Mé poděkování také patří všem kolegům z výzkumné skupiny Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie.

Děkuji za finanční podporu Grantové agentury ČR a Univerzitě Karlově.

Rovněž bych touto cestou chtěla vyjádřit poděkování své rodině, která mě po celou dobu studia podporovala a dodávala odvahu čelit novým výzvám.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Iveta Najmanová

Školitel: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Název disertační práce: Vliv polyfenolických látek na hladký cévní sval

Polyfenolické látky jsou jedny z nejrozšířenějších sekundárních metabolitů rostlin. Patří mezi ně široké spektrum látek od jednoduchých látek s jedním benzenovým jádrem až po polymerní sloučeniny. Pro tuto dizertační práci byly vybrány dvě skupiny, a to kumariny a flavonoidy. Cílem práce bylo zjistit jejich vliv na hladký cévní sval *in vitro* a *in vivo* podmínkách. V případě kumarinů toho bylo dosaženo sepsáním revíálního článku. Vliv flavonoidů včetně jejich metabolitů byl experimentálně otestován a některé výsledky již byly publikovány.

Prvním krokem mého výzkumu bylo provést screening metabolitů kvercetinu, nejvíce se vyskytujícího flavonolu v lidské potravě, a zjistit jejich vasorelaxační potenciál. Testování bylo prováděno na izolované hrudní aortě potkana. Při tomto testování byl jednoznačně nejúčinnější metabolit kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová (3-HPPA), která byla minimálně o řád účinnější než vlastní kvercetin a další metabolity (zejména kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová a 4-methylkatechol). Porovnání účinku těchto metabolitů na odporové cévě (*arteria mesenterica*) ale ukázalo na významné rozdíly, kde 3-HPPA byla

naopak méně účinná než další dva metabolity. V další části *in vitro* práce byl testován mechanismus účinku (cévy s odstraněným endotelem, blokátor NO syntázy nebo antagonisty muskarinových receptorů). I tyto výsledky ukázaly na odlišné mechanismy zejména při porovnání 3-HPPA a 4-methylcatecholu.

S *in vivo* experimenty jsme začali na Wistar:Han potkanech, u kterých byla sledována změna arteriálního krevního tlaku a srdeční frekvence po aplikaci zmíněných metabolitů. Signifikantní změny systolického i diastolického tlaku byly zjištěny po aplikaci dávek 10 mg/kg a vyšších. Antihypertenzní účinky byly také potvrzeny na potkanech s patologicky zvýšeným tlakem krve (spontánně hypertenzní potkani, SHR). Protože účinek těchto dávek byl krátkodobý a pokles tlaku krve byl rychle normalizován, přikročili jsme k simulaci dlouhodobého vstřebávání metabolitu ze střeva aplikací pomalé i.v. infúze. I v tomto případě jsme našli dávkově závislé účinky na pokles tlaku krve, ale pouze u nejvyšší aplikované dávky (5 mg/kg/min během 5 minut) byl pozorován statisticky významný účinek oproti kontrole. Účinek byl ale opět relativně krátkodobý. Současně jsme ale vyloučili, že pokles krevního tlaku byl způsoben účinkem na srdce a tedy potvrdili účinek na hladký cévní sval *in vivo*.

In vivo jsme také testovali kvercetin-3-O-glukuronid, který byl v *in vitro* podmínkách neúčinný, ale o němž jiná výzkumná skupina spekuluje, že je nosičem účinné látky (kvercetinu) a tedy v *in vivo* podmínkách odpovědnou látkou za pokles krevního tlaku po p.o. aplikaci kvercetinu. Tuto teorii ale vzhledem k našim výsledkům považujeme za nepravděpodobnou.

Součástí této práce je i *in vivo* testování speciálně upraveného kvercetinu pro i.v. podání ve fyziologickém roztoku. Vzhledem k lipofilitě kvercetinu jsme byli první skupinou, která mohla takto sledovat účinky kvercetinu bez přídavku organických solventů.

Bolusové podání kvercetinu snížilo krevní tlak jak akutně, tak v průběhu pěti hodin po aplikaci.

Závěrem lze shrnout, že se nám potvrdila naše počáteční teorie, tedy že některé metabolity kvercetinu, které vznikají metabolizací v tlustém střevě, mají vaseorelaxační potenciál a jsou tedy schopny ovlivnit tlak krve.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Iveta Najmanová, MCs
First Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.
Second Supervisor: Marie Vopršalová, Pharm.D., Ph.D.
Title of Doctoral Thesis: The effect of polyphenolic substances on vascular smooth muscle

Polyphenolic substances are one of the most abundant secondary plant metabolites. Many substances from simple phenols with one benzene core to the polymeric compounds belong to these groups. Two groups, coumarins and flavonoids, were selected for this dissertation. The aim of this thesis was to analyse their effect on vascular smooth muscle in *in vitro* and *in vivo* conditions. In the case of coumarins, the aim was reached by writing of a review article. The effect of flavonoids, including their metabolites was experimentally tested and some of the results have already been published.

The first step in my research was to perform a screening of metabolites of quercetin, the most occurring flavonol in the human diet, and compare their vasorelaxant potential. Experiments were performed on isolated rat thoracic aorta. During the testing, the most effective metabolite was definitely 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid (3-HPPA), which was at least one order more potent than quercetin and others metabolites (especially 3,4 dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol). Comparing of the effect of these

metabolites on a resistant vessel (*arteria mesenterica*) showed significant differences, where 3-HPPA was on the contrary less active than other two metabolites. In another part of *in vitro* study, the mechanism of action was tested (vessels without endothelium, an inhibitor of NO synthesis or a muscarinic receptor antagonist). Even these results pointed to different mechanisms of action, in particular when comparing 3-HPPA and 4-methylcatechol.

In vivo experiments were firstly carried out on Wistar:Han rats, in which the changes of arterial blood pressure and heart rate after the application of above mentioned metabolites were monitored. The significant decreases in systolic and diastolic pressures were showed after the application of doses of 10 mg/kg and higher. Antihypertensive effects were also confirmed on rats with pathologically elevated blood pressure (spontaneously hypertensive rats, SHR). Due to the short lasting effect of these doses and immediate normalization of blood pressure, we approached to the simulation of long lasting absorption of metabolite from colon by application of slow i.v. infusion. Also in this case we found out dose-dependent effects on blood pressure, but only at the highest concentration (5 mg/kg/min for 5 minutes) the statistically significant decrease comparing to the control was observed. The effect was again relatively short-lasting. At the same time, we excluded, that the decrease of blood pressure was caused by a depressive effect on the heart and so we confirmed the effect on vascular smooth muscle *in vivo*.

In vivo we also tested quercetin-3-O-glucuronide, which was ineffective under *in vitro* conditions and of which a different research group speculated that it is a carrier of active substance (quercetin) and thus also responsible for the *in vivo* decrease in blood pressure after oral quercetin administration. Regarding to our results, we consider this theory as unlikely.

Part of this thesis is *in vivo* testing of a specially modified quercetin for i.v. administration in saline. Regarding to the quercetin lipophilicity, we were the first group,

which could analyse the *in vivo* effect of quercetin without addition of organic solvents. Quercetin decreased the blood pressure immediately and also later during the first five hours after administration.

In conclusion, we proved our initial theory, thus some of quercetin metabolites, created by metabolism in the colon, have vasorelaxant potential and therefore are able to affect blood pressure.

Obsah

1. Teoretický úvod.....	1
1.1 Polyfenolické látky.....	1
1.1.1 Fenolické kyseliny.....	5
1.1.2 Lignany.....	7
1.1.3 Stilbeny.....	7
1.1.4 Kumariny.....	8
1.1.5 Flavonoidy.....	8
1.2 Účinky flavonoidů.....	13
1.2.1 Vztah flavonoidní struktury a vasodilatačních účinků.....	13
1.2.2 Antioxidační vlastnosti flavonoidů.....	15
1.3 Kvercetin.....	17
1.3.1 Farmakokinetika kvercetinu.....	19
1.3.2 Antihypertenzní působení kvercetinu.....	24
1.3.3 Metabolity kvercetinu a jejich vliv na hladký cévní sval.....	29
2. Cíle práce.....	32
3. Materiál a metodika.....	34
3.1 Zvířata.....	34
3.2 Chemikálie.....	34
3.3 Metodika.....	36
3.3.1 Bod 1 - <i>In vitro</i> screening vasoaktivních vlastností kvercetinu a jeho známých metabolitů na potkaní aortě.....	36
3.3.2 Bod 2 - <i>In vitro</i> screening vasoaktivních vlastností dalších metabolitů flavonoidů na potkaní aortě.....	40
3.3.3 Bod 3 - Porovnání účinků tří účinných metabolitů kvercetinu <i>in vitro</i> na potkaní <i>arteria mesenterica</i>	40
3.3.4 Bod 4 - <i>In vivo</i> účinky různých dávek účinných metabolitů kvercetinu na krevní tlak.....	41
3.3.5 Bod 5 - <i>In vivo</i> účinky infúze účinným metabolity kvercetinu na krevní tlak (simulace pomalé absorpce těchto látek z GITu).....	42
3.3.6 Bod 6 - <i>In vivo</i> analýza krevní tlak snižujícího vlivu účinných metabolitů.....	43

3.3.7 Bod 7 - Zjištění mechanismu účinku 3 účinných metabolitů v aortě potkana	49
3.3.8 Bod 8 - Ověření účinku kvercetinů a jeho metabolitu kvercetin-3-O-glukuronidu na potkanech	50
3.4 Statistická analýza	52
4. Výsledky	53
4.1 Bod 1 - <i>In vitro</i> screening vasoaktivních vlastností kvercetinů a jeho známých metabolitů na potkaní aortě	53
4.2 Bod 2 - <i>In vitro</i> screening vasoaktivních vlastností dalších metabolitů flavonoidů na potkaní aortě	59
4.3 Bod 3 - Porovnání účinků tří účinných metabolitů kvercetinů <i>in vitro</i> na potkaní <i>arteria mesenterica</i>	61
4.4 Bod 4 - <i>In vivo</i> účinky různých dávek účinných metabolitů kvercetinů na krevní tlak	63
4.5 Bod 5 - <i>In vivo</i> účinky infúze účinných metabolitů kvercetinů na krevní tlak (imitace pomalé absorpce těchto látek z GITu)	68
4.6 Bod 6 - <i>In vivo</i> analýza krevní tlak snižujícího vlivu účinných metabolitů	73
4.7 Bod 7 - Zjištění mechanismu účinku 3 účinných metabolitů v potkaní aortě	91
4.8 Bod 8 - Ověření účinku kvercetinů a jeho metabolitu kvercetin-3-O-glukuronidu na potkanech	94
5. Diskuze	103
6. Závěr a výhled do budoucna	110
7. Seznam zkratk	111
8. Přehled odborných publikací	112
8.1 Recenzované publikace v odborných časopisech s impaktním faktorem	112
8.2 Prezentace na konferencích	113
9. Reference	114
10. Soubor publikací	130

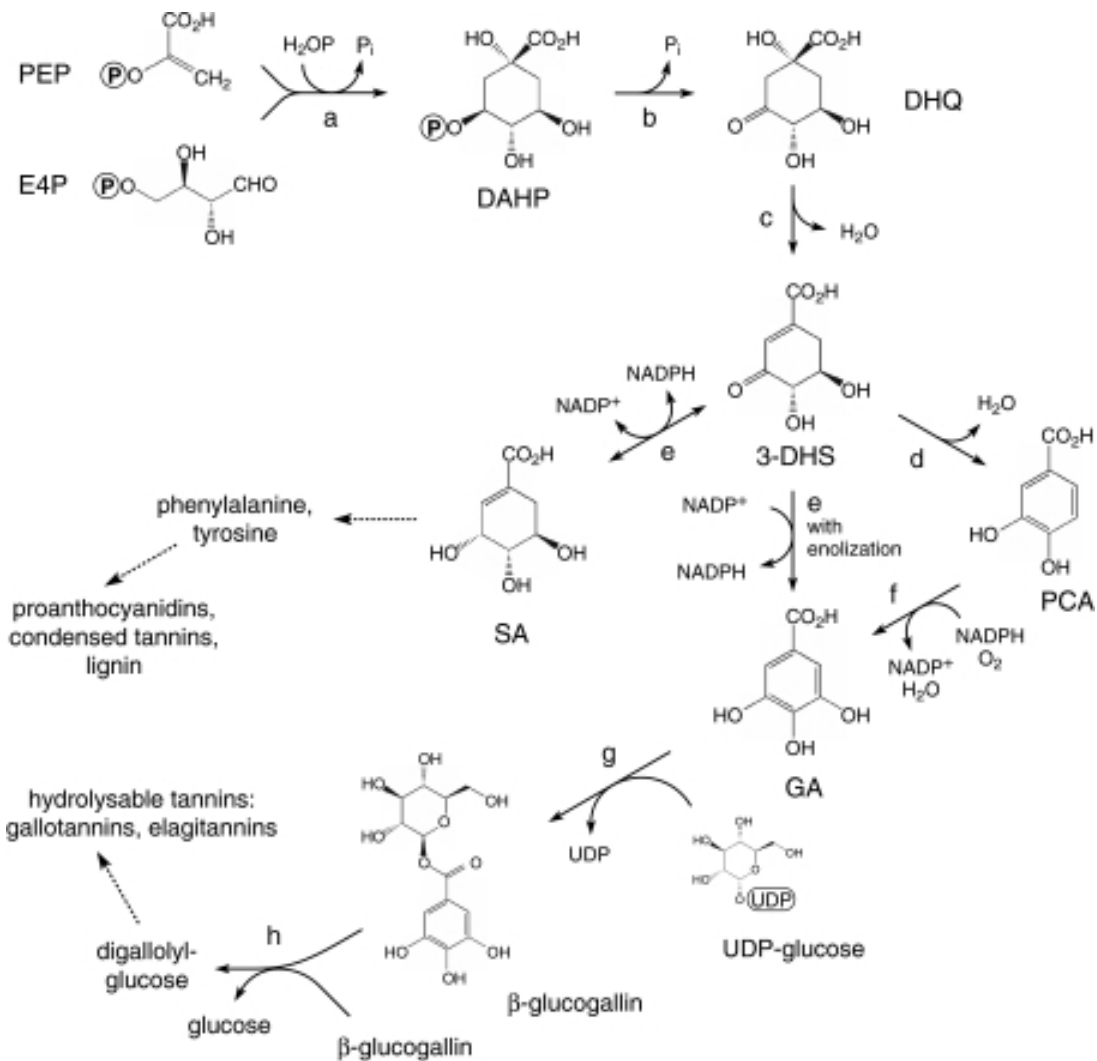
1. Teoretický úvod

1.1 Polyfenolické látky

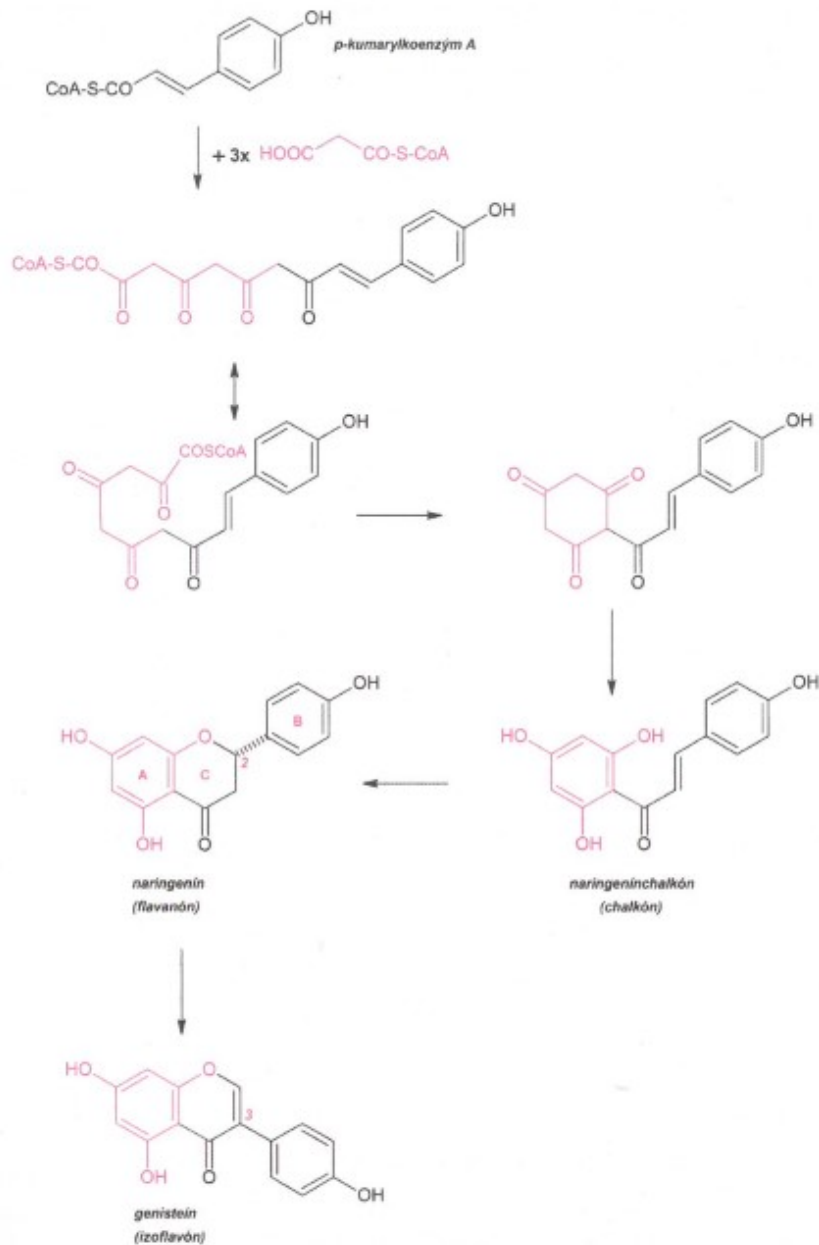
Polyfenolické látky jsou jedny z nejrozšířenějších sekundárních metabolitů rostlin a čítají přes osm tisíc zástupců různých struktur (Dai a Mumper 2010). Vyskytují se hojně v ovoci a zelenině a také v nápojích jako čaj, káva a víno. Hrají důležitou roli v růstu, rozmnožování a pigmentaci rostlin (např. zbarvení okvětních lístků díky anthokyanům, či zbarvení jader/zrn díky flobafenům). Uplatňují se také při ochraně rostliny před škodlivým UV zářením, škůdci a parazitům (Bravo 1998; Koes 1994). Jsou zodpovědné i za hořkou a trpkou chuť některých plodů (Brossaud 2001).

Pozornost je na ně dlouhodobě upřena zejména pro jejich antioxidační potenciál. Navíc vykazují antihypertenzní, antiaterogenní, antitrombotické, antidiabetické, antibakteriální, protizánětlivé a protinádorové účinky, které podle současných znalostí nemusí a většinou ani přímo nesouvisí s jejich antioxidační aktivitou (Bnouham *et al.* 2012; Calabriso *et al.* 2016; Konate *et al.* 2012; Mladenka *et al.* 2010; Ngamukote *et al.* 2011; Tan *et al.* 2011).

Přestože je pojem polyfenoly široce používán, jeho význam není vždy úplně stejně chápán. Principiálně by mělo jít o látky složené z více fenolických jednotek, ale stejným pojmem se může rozumět také látky obsahující aromatický cyklus substituovaný více hydroxylovými skupinami, včetně jejich funkčních derivátů (estery, glykosidy ad.). V nejširším slova smyslu se jimi dnes někdy rozumí, i když ne zcela správně, také jednoduché aromatické látky obsahující i jednu hydroxyskupinu (Bravo 1998; Manach *et al.* 2004). Na druhé straně jsou tyto aromáty syntetizovány dvěma možnými metabolickými cestami, což může částečně ospravedlnit tuto nejširší definici. Tyto metabolické cesty, šikimátová a polyketidová, jsou zobrazeny v obrázcích 1-2.



Obr. 1. Šikimátová cesta syntézy polyfenolů. Syntéza začíná kondenzací fosfoenolpyruvátu (PEP) s erytrózou-4-fosfátem (E4P), která postupně vede ke vzniku kyseliny šikimové (SA) a kyseliny gallové (GA) a celé řadě polyfenolů. Převzato z Muir *et al.* (2011). DAHP, 7-fosfát kyseliny 3-deoxy-D-arabino-heptulosonová kyselina; DHQ, kyselina 3-dehydrochinová; 3-DHS, kyselina 3-dehydrošikimová; PCA, kyselina protokatechová (3,4-dihydroxybenzoová kyselina). Enzymy: a, DAHP syntáza; b, DHQ syntáza; c, DHQ dehydratáza; d, DHS dehydratáza; e, šikimát dehydrogenáza; f, PCA hydroxyláza (hypotetický enzym); g, UDP-glukóza: gallát 1-O-galloyltransferáza



Obr. 2. Polyketidová cesta syntézy flavonoidů z *p*-kumarylkoenzýmu A. Převzato z Nagy *et al.* (2011).

Přijmeme-li tedy tuto nejširší definici, tak polyfenolické sloučeniny zahrnují velmi strukturálně odlišné látky od jednoduchých fenolických látek přes kondenzované cykly až k polymerním strukturám. Nejčastěji používané dělení se opírá o jejich základní strukturu: fenolické kyseliny, kumariny, flavonoidy, lignany a stilbeny.

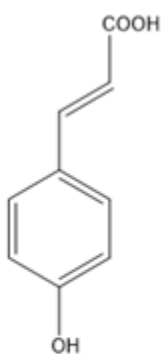
Většina polyfenolů se v rostlinách vyskytuje jako konjugáty s jedním, nebo více glykosidickými jednotkami, připojenými k základní struktuře v různých pozicích většinou vazbou přes kyslík (O-glykosidy), ale někdy také přímo na uhlík základního skeletu (C-glykosidy) (Tsao 2010). Připojeným cukrem bývá ve většině případů glukóza, ale setkáme se také s galaktózou, rhamnózou, xylózou a arabinózou. Dalšími připojenými strukturami mohou být karboxylové a organické kyseliny, amidy a lipidy. Časté je také spojení s dalšími fenolickými látkami (Bravo 1998; Pandey a Rizvi 2009).

1.1.1 Fenolické kyseliny

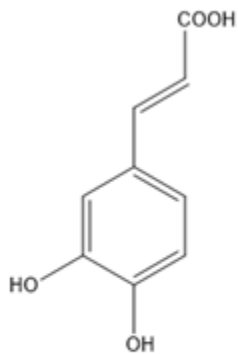
Podle výsledků nedávno vydané studie HAPPIEE, zaměřené na odhadnutí denního příjmu polyfenolů mezi polskou populací, je denní příjem fenolických kyselin zhruba 800 mg (Grosso *et al.* 2014). V rostlinách se vyskytující polyfenolické kyseliny mohou být rozděleny na základě své struktury do dvou skupin. Jedná se o hydroxylové deriváty kyseliny benzoové a skořicové (Tsao 2010). Je třeba ale zmínit, že polyfenolické látky se mikroorganismy, včetně lidské mikroflóry, metabolizují i na deriváty jiných malých aromatických kyselin. Významné jsou hlavně deriváty kyseliny propionové a fenyloctové (např. viz Obr. 8).

Deriváty hydroxyskořicové kyseliny jsou jedny z nejčastěji se vyskytujících fenolických látek v lidské stravě. Najdeme je ve velkém množství v ovoci, obilovinách, zelenině, ale také v nápojích jako je káva a víno (King a Young 1999; Tsao 2010). Tyto sekundární metabolity jsou odvozeny od fenylalaninu a tyrozinu. Základní strukturou je aromatický cyklus, na který je připojen tříuhlíkatý postranní řetězec s jednou dvojnou vazbou. Nejvýznamnějšími deriváty jsou p-kumarová kyselina, kávová kyselina, ferulová kyselina a kyselina sinapová (Obr. 3.). Ve volných formách se prakticky nevyskytují. Časté jsou především glykosidy nebo estery kyselin chinové, šikimové nebo vinné (Alam *et al.* 2016).

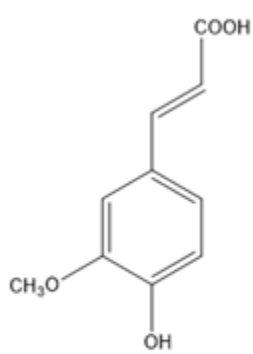
Derivátů hydroxybenzoové kyseliny je v rostlinách konzumovaných člověkem jen malé množství (D'Archivio *et al.* 2007). Tvoří součást komplexnějších struktur, jakými jsou hydrolyzovatelné taniny. Mezi základní struktury patří zejména kyselina gallová a její dimer - kyselina ellagová (Obr. 4) (King a Young 1999). Kyselina ellagová se nachází v potravě ve větším množství, a to ve výrazně zbarvených plodech, zejména v ostružinách (až 38 mg/kg), malinách (až 40 mg/kg) a jahodách (5,5 mg/kg). Denní příjem kyseliny ellagové je odhadován na 90 mg (Komorsky-Lovric 2011).



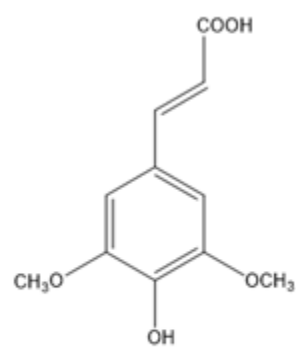
kyselina *p*-kumarová



kyselina kávová

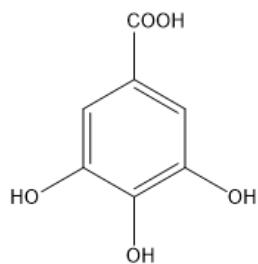


kyselina ferulová

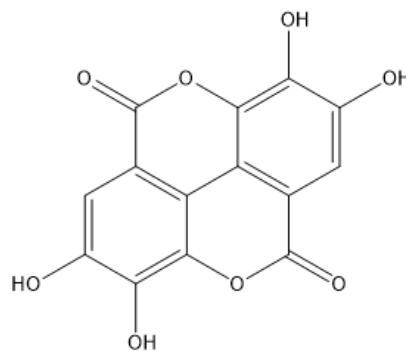


kyselina sinapová

Obr. 3. Nejvýznamnější deriváty hydroxyskořicových kyselin.



kyselina gallová



kyselina elagová

Obr. 4. Chemické struktury kyseliny gallové a kyseliny elagové.

1.1.2 Lignany

Jedná se o dimery fenylypropanových jednotek. Na rozdíl od flavonoidů se vyskytují ve většině případů ve volné formě. Pouze minoritní část je ve formě glykosidů. Secoisolariciresinol se nachází ve lněných semíncích a to v koncentraci dosahující až 3,7 g/kg. (D'Archivio *et al.* 2007). Dalšími lignany obsaženými ve lněných semínkách jsou sesamin, sesamolin, sesaminol a sesamol (Dar a Arumugam 2013). Lignany patří mezi takzvané fytoestrogeny. Podléhají metabolizaci střevními bakteriemi v tlustém střevě za vzniku enterodiolu a enterolaktonu (Lampe *et al.* 2006). Těmto látkám je přisuzováno antihypertenzní, hypocholesterolemické a protinádorové působení (Dar a Arumugam 2013). V rámci této dizertační práce nebyly lignany testovány.

1.1.3 Stilbeny

Hlavním zástupcem stilbenů je resveratrol, který je v malé míře zastoupen i v lidské stravě. Vyskytuje se především v hroznovém vínu, burských oříšcích a moruších. Nachází se ve slupce grepů, které obsahují až 100 g/kg resveratrolu. Je produkován rostlinami, při patologických stavech, jakými je třeba infekce, poranění, nebo jiné stresové situace (Aggarwal *et al.* 2004; D'Archivio *et al.* 2007). Pověst resveratrolu a jeho potenciálně příznivého biologického účinku značně utrpěla stažením velké řady článků, které se ukázaly jako podvody, např. publikace (Bezstarosti *et al.* 2006; Das *et al.* 2006)

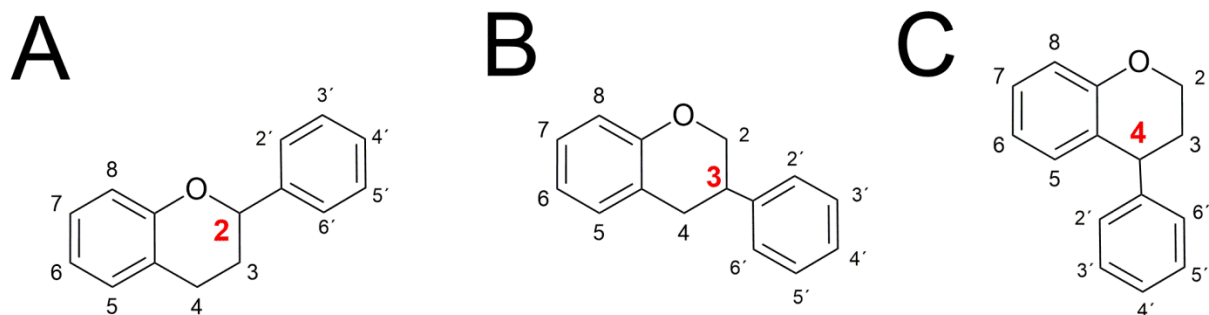
1.1.4 Kumariny

Kumariny patří mezi polyfenolické látky, jejichž základní kostru tvoří benzopyranový kruh. Mezi ty nejvýznamnější přírodní patří dikumarol, umbelliferon, herniarin, aesculetin, psoralen a imperatorin. Naše skupina nedávno shrnula farmakologické vlastnosti kumarinů. Ty zahrnují významné antihypertenzní, protirakovinné, antikoagulační, antibakteriální a protizánětlivé účinky (Filipsky *et al.* 2015; Najmanova *et al.* 2015). Z tohoto důvodu nebude této problematice věnována další pozornost (publikace Najmanová *et al.* (2015) je v příloze na str. 132).

1.1.5 Flavonoidy

Flavonoidy jsou jednou z největších polyfenolických skupin a čítají přes čtyři tisíce přirozeně se vyskytujících sloučenin. Výzkum těchto látek se v minulosti zaměřil zejména na jejich antioxidačních účinky, které jsou obecně silnější než antioxidační účinky vitamínů C, E a karotenoidů. V současné době víme, že jejich účinky jsou ale mnohem rozsáhlejší a často nezávislé na antioxidační aktivitě (Mladenka *et al.* 2010). Největších koncentrací je dosaženo v ovoci, zelenině, semenech, bylinách, koření a nápojích jakými jsou například víno, čaj a kakao (Heim *et al.* 2002). Určit přesný denní příjem flavonoidů je velmi obtížné a publikované údaje se značně liší. Hlavní rozdíly jsou dány zejména tím, které podskupiny flavonoidů byly analyzovány. Některé studie totiž nezahrnuly flavanoly, které jsou nejhojnější flavonoidní složkou lidské potravy. Studie, které zahrnuly pouze flavanoly a flavony udávají denní příjem okolo 20 mg, zato studie které zahrnuly flavanoly včetně proanthokyanidinů hovoří o denním flavonoidním příjmu 0.35 - 1 g a některé i více (Cassidy *et al.* 2011; Hertog *et al.* 1997; Mink *et al.* 2007; Sesso *et al.* 2003).

Flavonoidy jsou nízkomolekulární látky, jejichž základní struktura se skládá z patnácti atomů, rozložených v difenylpropanovém ($C_6-C_3-C_6$) uskupení. Jedná se tedy o dva aromatické cykly A a B, navzájem spojené tříuhlíkatým řetězcem, který obvykle tvoří třetí kyslíkatý heterocyklus C. Není-li spojovací řetězec zacyklen, hovoříme o chalkonech či dihydrochalkonech. Je-li tvořen i pyranový cyklus, rozeznáváme na základě jeho stupně hydrogenace a hydroxylace následující skupiny flavonoidů: flavony, flavonoly, flavanony, flavan-3-oly (katechiny) a anthokyanidiny. U těchto struktur je kruh B připojen ke kruhu C v pozici 2 (Obr. 5A.). Je-li připojen v pozici 3, jedná se o isoflavonoidy (Obr. 5B) (Tsao 2010). Existují také neoflavonoidy s kruhem C připojeným v pozici 4 (Obr. 5C) – v přírodě jde o velmi raritní látky (Kushwaha *et al.* 2016; Lee *et al.* 2014).



Obr. 5. Základní struktury flavonoidů se zacykleným tříuhlíkatým spojovacím řetězcem. Flavonoidy (A), isoflavonoidy (B) a neoflavonoidy (C).

Flavony

Pro tyto struktury je charakteristická dvojná vazba mezi C2 a C3, ale na rozdíl od flavonolů není přítomna hydroxylová skupina na C3. Jsou méně běžné než flavonoly. Mezi nejvýznamnější zástupce patří apigenin a luteolin vyskytující se především v petrželi a celeru, v menším množství byly detekovány i v červené paprice. Vyskytují se také ve slupkách citrusových plodů (D'Archivio *et al.* 2007; Hollman a Arts 2000).

Flavonoly

Flavonoly jsou nejrozšířenějšími monomerními flavonoidy. V posledních několika desetiletích je na ně zaměřena pozornost, a to zejména pro jejich potenciaální prospěšnost při prevenci kardiovaskulárních onemocněních (Arts a Hollman 2005).

Nejvýznamnějšími zástupci této skupiny jsou kvercetin, kaempferol, myricetin a isorhamnetin. Společným rysem je dvojná vazba mezi C2 a C3 a hydroxylová skupina na C3. Flavonoly se nacházejí v relativně nízkých koncentracích, jejich nejbohatšími zdroji jsou cibule, kapusta, brokolice, pórek a borůvky. Vysoké koncentrace jsou dosaženy i v nápojích, především v čaji a v červeném víně (Hertog *et al.* 1992). V rostlinách se vyskytují v glykosidované formě. Připojeným cukrem bývá nejčastěji glukóza nebo rhamnóza. Je také důležité zmínit, že syntéza flavonolů je stimulována světlem, proto je jejich množství větší v listech a slupkách plodů, které jsou více vystavené slunci (Manach *et al.* 2004).

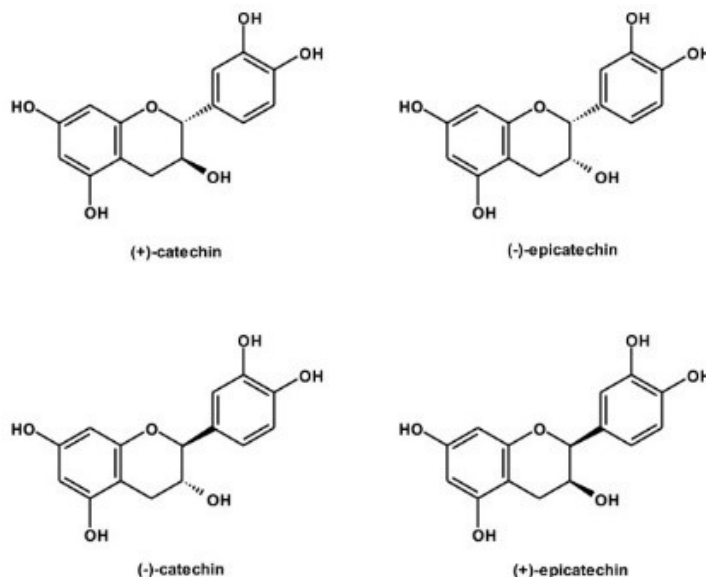
Flavanony

Flavanony postrádají dvojnou vazbu v kruhu C a je pro ně charakteristická glykosylace disacharidem na C7. Vyskytují se především v citrusových plodech, ale také v rajčatech nebo v aromatických bylinách. Mezi zástupce patří hesperidin a narirutin, jejichž

největší koncentrace jsou v bílé části slupky a také v membránách oddělující jednotlivé segmenty plodu (D'Archivio *et al.* 2007).

Flavanoly

Flavanoly nebo flavan-3-oly se také nazývají katechiny. Od ostatních flavonoidů se liší nepřítomností ketoskupiny v poloze C4 a navíc postrádají dvojnou vazbu mezi C2 a C3. Dva posledně zmíněné uhlíky jsou chirálními centry, existují tedy obecně 4 diastereoisomery. Nejvýznamnějšími monomery jsou katechin a epikatechin. Katechin má *trans* konfiguraci, epikatechin má *cis* konfiguraci (Obr. 6). Jsou schopny tvořit polymery (proanthokyanidiny) (Tsao 2010). Vyskytují se také v kombinaci s kyselinou gallovou a ellagovou (King a Young 1999). Tyto flavonoidy se nacházejí ve slupkách grepů, jablek a borůvek (Tsao 2010). Dlouhodobým skladováním se z plodů vytrácí (King a Young 1999).



Obr. 6. Porovnání struktur nejvýznamnějších flavanolových monomerů. Převzato z Hurst *et al.* (2011).

Anthokyanidiny

Jedná se o ve vodě rozpustné pigmenty zodpovědné za červené až modré zbarvení květů, plodů a semen. Zbarvení je závislé na pH. V kyselém prostředí budou převládat červené barvy, v zásaditém pak barvy modré. Nejvýznamnějšími anthokyanidiny jsou delphinidin, cyanidin, pelargonidin, malvidin, peonidin a petunidin (Tsao 2010). Vzhledem k přítomnosti náboje na molekuly O v kruhu C se minimálně vstřebávají a většina, ne-li všechny jejich biologické účinky jsou zprostředkovány jejich metabolity tvořenými zejména mikroflórou v lidském tlustém střevě (Mazza *et al.* 2002; Williamson a Clifford 2010).

Isoflavonoidy

V přírodě se isoflavonoidy vyskytují hlavně jako isoflavony. Isoflavonoidy, jak bylo zmíněno, se od ostatních flavonoidů liší zejména připojením kruhu B v pozici C3 (Obr. 5B). Hlavními zástupci (aglykony) jsou genistein, daidzein, biochanin A a formononetin. Vyskytují v luštěninách, a to hlavně v sóji (King a Young 1999; Tsao 2010). Z hlediska kardiovaskulární problematiky jsou velmi zajímavé. Při jejich podávání bylo prokázáno u celé řady klinických studií jejich mírné hypolipidemické a hypotenzní působení (Bakhit *et al.* 1994; Pipe *et al.* 2009; Wangen *et al.* 2001). Ve své práci jsem se touto skupinou látek nezabývala, ale tyto látky a jejich metabolity jsou v současné době zkoumány naší skupinou.

1.2 Účinky flavonoidů

Vzhledem k tématu této dizertační práce bude následně pozornost věnována současným znalostem o účincích flavonoidů na hladký cévní sval. Stručně bude také pojednáno o nejvíce studovaném antioxidačním působení flavonoidů, aby byla ukázána minimální souvislost mezi těmito dvěma typy účinků

1.2.1 Vztah flavonoidní struktury a vasodilatačních účinků

Nejčastěji byly vasorelaxační účinky flavonoidů testovány na cévách s neporušeným nebo odstraněným endotelem kontrahovaných α_1 agonistou, KCl nebo analogem thromboxanu A_2 U46619 (Duarte *et al.* 1993; Chan *et al.* 2000; Xu *et al.* 2007). Podle dostupných výsledků jsou nejúčinnějšími vasorelaxačními flavonoidy flavonoly, následovány flavony a flavanoly (Duarte *et al.* 1993). Některé výzkumy tuto posloupnost neprokázaly a přiřklí se k srovnatelné účinnosti u flavonolů a flavonů (Chan *et al.* 2000; Xu *et al.* 2007).

Pro dobrý vasorelaxační účinek by měla molekula splňovat určité požadavky. Hydroxylové skupiny na kruhu A přispívají k vasodilatačnímu účinku, zejména jsou-li umístěné v poloze 5 a 7, jako je tomu v případě chrysinu (5, 7-dihydroxyflavon). Chrysin má vyšší účinnost než baicalein, který má oproti chrysinu navíc hydroxyskupinu v pozici 6. Z toho vyplývá, že hydroxyskupina v poloze 6 nebo přítomnost tří hydroxyskupin v polohách 5, 6 a 7 na kruhu A snižují účinnost flavonoidu (Ajay *et al.* 2003). Fisetin, který oproti kvercetinů postrádá hydroxyskupinu v poloze 5, je účinnější při inhibici kontrakce navozené KCl než kvercetin, ale u cévy kontrahované fenylefrinem je účinnost opačná. Podle tohoto výsledku by se dalo říci, že substituce v C5 pozici zvyšuje selektivitu flavonoidů vůči vasokonstrikci navozené α_1 agonisty. (Ajay *et al.* 2003). Substituce hydroxylovými skupinami na kruhu A sice přispívá k vasorelaxačnímu působení, ale zdá se, že není pro vasorelaxační

účinky tak důležitá, jako substituce kruhu B a C, neboť 3,3',4'-trihydroxyflavon, který nemá žádný substituent na kruhu A je účinnější v inhibici kontrakce cévy vyvolané fenylefrinem než zmíněný chrysin, který má 5 a 7 dihydroxy substituci na kruhu A, ale žádný substituent na kruhu B (Chan *et al.* 2000).

Ve výše zmíněných případech je kruh B připojen ke kruhu C v poloze 2, ale i isoflavonoidy, které mají B kruh připojený v poloze 3, vykazují velmi dobré vasorelaxační vlastnosti, jak bylo poznamenáno dříve. Opět substituce kruhu A je významná a přispívá k rozdílům mezi látkami. Příkladem je genistein, který má hydroxyskupiny v poloze 4', 5 a 7 a je účinnější než daidzein, který postrádá hydroxyl v poloze 5 (Woodman *et al.* 2005).

Duarte *et al.* (1993) vyzoroval při testování několika flavonoidů (kvercetin, kaempferol, luteolin a apigenin), že blokování nebo odstranění OH skupiny v poloze 3' výrazně snižuje vasodilatační účinek (Duarte *et al.* 1993). Při porovnání zástupců flavonoidů s různým rozložením hydroxyskupin na kruhu B bylo zjištěno následující pořadí ve vztahu k účinku: 3'-hydroxyflavanol > 3',4'-dihydroxyflavanol > 7,4'-dihydroxyflavanol > 3',4'-dihydroxyflavon. I když 3',4'-dihydroxyflavanol inhibuje kontrakci navozenou fenylefrinem méně než 3'-hydroxyflavanol, v případě inhibice kontrakce vyvolané KCl jsou na tom tyto látky stejně. To znamená, že substituce hydroxylem v poloze 3' zvyšuje účinek, zatímco 4'-hydroxyskupina buď nemá vliv, nebo účinek snižuje (Woodman *et al.* 2005). Srovnání vasodilatačních účinků morinu (2', 4'-dihydroxyskupina) a kvercetinu (3',4'-dihydroxyskupina) ukázalo na nižší účinnost morinu a potvrzuje tak fakt, že 4'-hydroxyskupina je bez většího významu a 2'-hydroxyl má menší vliv na vasodilatační vlastnosti než 3'-hydroxyskupina (Herrera *et al.* 1996). Tento předpoklad potvrzuje i výsledek srovnání vasorelaxačních schopností kaempferolu, kvercetinu a myrcetinu, tedy tří látek, které se liší pouze množstvím a umístěním hydroxylových skupin na kruhu B. Nejúčinnější byl

kaemferol (jen 3'-hydroxyskupina) následován kvercetinem (3',4'-dihydroxyskupina). Myrcetin se třemi hydroxylovými skupinami v polohách 3',4' a 5' na kruhu B byl nejméně aktivní (Xu *et al.* 2007).

Klíčový význam má také hydroxylová skupina v poloze 3 na kruhu C. Jak je popsáno výše, ukázaly se většinou substituované flavonoly účinnější než substituované flavony (Woodman *et al.* 2005). Tato hydroxyskupina by mohla být důležitá pro navození relaxace zapříčiněné uvolněním NO, i když diadzein a naringenin, které hydroxyskupinu v pozici 3 nemají, vykazují na NO závislou relaxaci také (Ajay *et al.* 2003; Chan *et al.* 2000). Oproti tomu flavony (apigenin, luteolin a chrysin), které postrádají hydroxylovou skupinu v poloze 3, vykazují na endotelu nezávislou relaxaci (Chan *et al.* 2000).

Kromě hydroxylových substituentů je také důležitá ketoskupina v poloze 4 a dvojná vazba mezi C2 a C3 (Dong *et al.* 2009; Duarte *et al.* 1993). Blokace důležitých hydroxylových skupin metylací nebo glykosilací snižuje účinek, stejně tak napojení C-glykosidu v poloze 3 nebo 8 (Xu *et al.* 2007).

1.2.2 Antioxidační vlastnosti flavonoidů

Antioxidační vlastnosti flavonoidů mohou být zprostředkovány třemi možnými mechanismy působení: 1) přímou neutralizací reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS), nebo nepřímo zvýšením účinnosti jiných, zejména endogenních antioxidantů, 2) potlačením tvorby RONS inhibicí enzymů, které je tvoří, nebo 3) chelatací stopových prvků (železo, měď) hrajících také roli při vzniku RONS (Dai a Mumper 2010; Mladenka *et al.* 2010).

Antioxidační účinky těchto látek závisí na množství, umístění a typu substituentů navázaných na základní strukturu flavonoidů. Obecně je hydroxylová substituce častá zejména v polohách 3, 5, 7, 3', 4' a 5'. Neplatí ale, že čím více hydroxylových skupin je na

molekulu navázáno, tím větší je i antioxidační působení, důležitější je totiž lokalizace těchto skupin (Firuzi *et al.* 2004).

Pro neutralizaci RONS je důležité zejména uspořádání hydroxylových skupin na kruhu B, které poskytují vodíkový proton nebo elektron hydroxylovým, peroxidovým a peroxytrilovým radikálům a stabilizují je za vzniku poměrně stabilních flavonoidních radikálů. Charakteristickým rysem nejúčinnějších antioxidantů je umístění hydroxylových skupin současně v poloze 3' a 4', případně ještě i v poloze 5'. Při odtrhnutí vodíků z těchto hydroxylů dochází k delokalizaci elektronů a tvorbě stabilního ortho-semichinonového radikálu. Jsou-li hydroxylové skupiny uspořádány na B kruhu jinak, snižuje se antioxidační aktivita a při odtržení vodíkového atomu jsou také tvořeny málo stabilní radikály flavonoidů (Heim *et al.* 2002). Je nutno také zmínit, že přítomnost *o*-dihydroxyskupiny na kruhu A vede také k velmi účinným antioxidantům, aniž by musela být současně přítomna *o*-dihydroxyskupina v kruhu B (Rice-Evans *et al.* 1996).

K vyšší antioxidační aktivitě také přispívá dvojná vazba mezi C-2 a C-3 a ketonická skupina v poloze 4 na kruhu C, které se uplatňují při delokalizaci elektronů a odtržení vodíků hydroxyskupin kruhu B. Na kruzích A a C hrají roli i hydroxyskupiny v poloze 3, 5 a 7. Zejména hydroxyskupina v poloze 3 je esenciální. Je-li přítomna, má molekula flavonoidu planární uspořádání, které umožňuje konjugaci a delokalizaci elektronů a zvyšuje tím stabilitu flavonoidního radikálu. Odstraněním této hydroxylové skupiny dojde k pootočení kruhu B vůči zbytku molekuly a tím se sníží i antioxidační aktivita. Analogicky zablokováním této hydroxylové skupiny methylací nebo glykosylací se výrazně snižuje účinek (van Acker *et al.* 1996).

Na druhou stranu nemá na antioxidační aktivitu vliv zacyklení tříuhlíkatého spojovacího řetězce, neboť i chalkony jsou v tomto směru aktivní. Zablokování

hydroxyskupiny v poloze C-6 metylací také neovlivňuje antioxidační aktivitu (Dai a Mumper 2010; Heim *et al.* 2002).

Některé flavonoidy jsou schopny i vázat stopové prvky (Fe^{2+} a Cu^+) s vysokou afinitou a zabraňovat tak tvorbě radikálů. Takto účinné jsou zejména látky s hydroxylovými skupinami v polohách 3' a 4' na kruhu B, 6 a 7 v kruhu A, s 3-hydroxy-4-keto nebo 4-keto-5-hydroxylovým uspořádáním. Baikalein se zmíněnými dihydroxyskupinami v kruhu A byl dokonce stejně účinným chelátorem železa jako standardní chelátor deferoxamin (Dai a Mumper 2010; Mladenka *et al.* 2011).

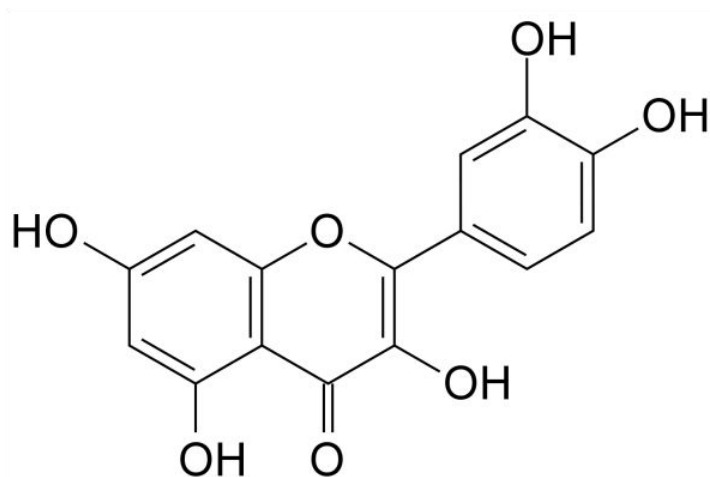
Srovnáme-li tedy nejdůležitější strukturní vlastnosti flavonoidů nutných pro antioxidační (neutralizaci RONS) nebo chelatační působení s vasorelaxačními vlastnostmi, ukáže se, že zde je jen málo společných vlastností. Tento fakt naznačuje, že vasodilatační působení nemá příliš vztah k antioxidačním účinkům.

1.3 Kvercetin

Kvercetin (Obr. 7) je nejrozšířenější flavonol, a proto byl i vybrán jako modelová látka pro tuto dizertační práci. Tvoří asi 63% z celkového příjmu flavonů a flavonolů (Hertog *et al.* 1994). Odhaduje se, že celkový příjem flavonů a flavonolů se pohybuje mezi 23 – 26 mg/den (Hertog *et al.* 1994; Hertog *et al.* 1993b), ovšem existují velké rozdíly v jejich příjmu mezi různými státy (Grosso *et al.* 2014; Chun *et al.* 2007; Justesen *et al.* 2000; Zhang *et al.* 2010). Průměrný denní příjem kvercetinu lze odhadnout na 16 mg/den (Hertog *et al.* 1993b; Hollman a Arts 2000).

Díky studii Hertog *et al.* (1992), která se zaměřila na stanovení obsahu flavonoidů v některých běžně konzumovaných potravinách, si můžeme udělat lepší obrázek o výskytu kvercetinu v lidské potravě. Největší koncentrace kvercetinu byla zjištěna v cibuli (284-486

mg/kg). Potravinami bohatými na kvercetin jsou také kapusta (284-486 mg/kg), fazolové lusky (32-45 mg/kg), brokolice (30 mg/kg), hlávkový salát (14 mg/kg), ostatní zkoumaná zelenina měla obsah kvercetinu pod 10 mg/kg a ovoce pod 15 mg/kg. Výjimkou byla jablka s obsahem 21-72 mg/kg (Hertog *et al.* 1992). Co se nápojů týče, byl největší obsah kvercetinu nalezen v černém čaji (10 – 25 mg/l) a dále v červeném víně (4-16 mg/l) (Hertog *et al.* 1993c).



Obr. 7. Základní struktura kvercetinu

1.3.1 Farmakokinetika kvercetinu

Biologická dostupnost

Flavonoidy se vyskytují přirozeně ve formě glykosidů, esterů nebo polymerů, které se málo nebo vůbec vstřebávají (Grassi *et al.* 2009). Glykosidy jsou těžko vstřebatelné pasivní difuzí, neboť připojené cukerné složky zvyšuje hydrofilitu molekuly. Proto musí být nejdříve hydrolyticky odštěpena cukerná složka a následně mohou některé lipofilnější aglykony projít fosfolipidovou dvojvrstvou buněčných membrán (Murota a Terao 2003).

Aglykony se mohou začít vstřebávat již v žaludku. Podle studie Crespy *et al.* (2002) se v žaludku vstřebá asi 38% z podaného množství kvercetinu, který se v průběhu 20 minut od podání objevuje ve žluči (Crespy *et al.* 2002). Většina glykosidů se ale dostane v nezměněné podobě až do tenkého nebo tlustého střeva. Následně dochází k hydrolyze a odštěpení cukerných zbytků, a to buď pomocí intestinálních enzymů, nebo činností střevních bakterií tlustého střeva.

Hydrolytické štěpení glykosidů se děje za pomoci enzymu známého jako laktáza-florizin hydroláza (LPH). Tento enzym je vázán na apikální stranu kartáčového lemu tenkého střeva a slouží primárně k štěpení laktózy a deglykosylaci hydrofobních substrátů jakým je i phlorizin.

Dalším enzymem, který se podílí na odštěpování cukerných zbytků je β -glukosidáza. Tento enzym štěpí glykosidicky vázané glukózy a nachází se v cytosolu enterocytů (Day *et al.* 2000; Day *et al.* 1998). Glukosidy se do střevních buněk mohou dostat prostřednictvím glukózových transportérů SGLT-1 (Walgren *et al.* 2000). Mezi ty nejvýznamnější glukosidy kvercetinu patří 3-O- β -D-glukosid, kvercetin 4'-O- β -glukosid a kvercetin 3,4'-O- β -diglukosid. Na basolaterální stranu se dostanou nejrychleji a nejvíce konjugáty a methylkonjugáty vzniklé přeměnou kvercetin-4-O-glukosidu, neboť β -glukosidázy jak v lidském, tak potkaním střevě

preferují právě štěpení v pozici 4' před pozicí 3 (Day *et al.* 1998; Murota *et al.* 2000). Může to také souviset s vyšší lipofilitou kvercetinu glykosylovaného v pozici 4' ve srovnání s pozicí 3 (Murota *et al.* 2000).

Aglykony vzniklé v enterocytech podstupují konjugační reakce s uridin-5'-difosfátglukuronosyltransferázou, fenolsulfotransferázou a katechol-O-metyltransferázou. Vzniklé konjugáty mohou dále prostoupit do jater nebo až do systémové cirkulace, nebo mohou být navraceny zpět do lumen střeva prostřednictvím multidrug resistance associated protein-2 (MRP-2) (Crespy *et al.* 1999; Walgren *et al.* 2000).

Glykosidy, které nejsou hydrolyzovány v tenkém střevě postupují dále do tlustého střeva, kde jsou štěpeny bakteriálními hydrolázami (α -ramnosidáza, β -glukosidáza, endo- β -glukosidáza, β -glukuronidáza, C-glykosidáza, β -glykosidáza) (Kim *et al.* 1998).

Srovnání absorpce kvercetinu, jeho glukosidů a rutinu

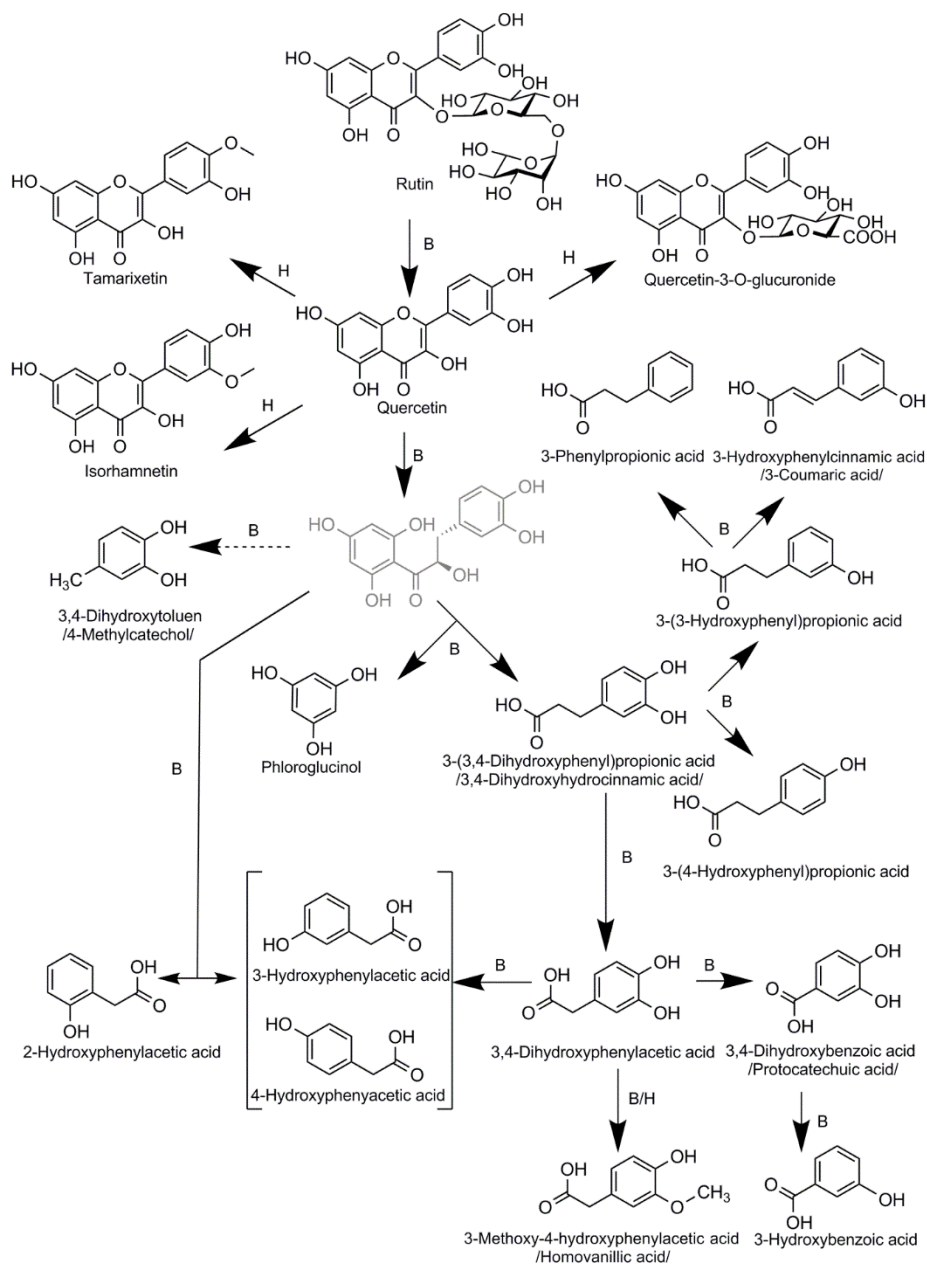
Mnoho studií se věnovalo porovnání absorpce kvercetinu a rutinu (kvercetin-3-rutinosidu). V těchto studiích bylo zjištěno, že aglykon kvercetinu prostupuje do intestinální stěny rychleji než kvercetin vzniklý hydrolýzou rutinu (Carbonaro a Grant 2005; Crespy *et al.* 1999; Graefe *et al.* 2001; Hollman *et al.* 1999; Jaganath *et al.* 2009; Manach *et al.* 1997). Určité koncentrace konjugátů kvercetinu jsou detekovatelné v plasmě již 0.5 – 0.7 h po podání kvercetin-4'-O- β -glukosidu, zatímco konjugáty kvercetinu uvolněné z rutinu byly detekovány až za 6 – 9 h (Graefe *et al.* 2001; Hollman *et al.* 1999). Toto naznačuje, že rutin není štěpen v tenkém střevě, ale až bakteriemi tlustého střeva. Absorpce kvercetinu není úplná ani v horních částech trávicího traktu a většina (52%) kvercetinu se nedostane do systémové cirkulace, nýbrž je transportována zpět do lumen střeva ve formě konjugátů. Jedná se především o glukuronidy a jejich metoxylované deriváty (64%) a dále sulfáty (36%) (Crespy *et al.* 1999). Srovnáme-li absorpci 20 mg kvercetinu jako aglykonu, 3-O-glukosidu, 3-O-

rhamnosidu s rutinem zjistíme, že nejvyšších koncentrací v plasmě po 4 hodinách dosahují konjugáty vzniklé z kvercetin-3-O-glukosidu ($33,2 \pm 3,5 \mu\text{M}$), dále z aglykonu ($11,7 \pm 1,8 \mu\text{M}$) a pak metabolity z rutinu ($2,8 \pm 2,0 \mu\text{M}$). Metabolity kvercetin-3-O-rhamnosidu nebyly v plasmě detekovány naopak vůbec (Morand *et al.* 2000).

Hydrolýza rutinu probíhá opravdu podle dostupných studií až v tlustém střevě, díky enzymům střevních bakterií. To bylo potvrzeno i na bezmikrobních potkanech krmených rutinem, kteří jej nebyli schopni zpracovat, a byl tak vyloučen v nezměněné podobě ve stolici (Griffiths a Barrow 1972). Při degradaci rutinu je nejprve odštěpena cukerná složka α -ramnosidázou a β -glukosidázou produkovanou například Bacteriodes JY-6 (Kim *et al.* 1998). Vzniklý aglykon může být vstřebán. Jeho biologická dostupnost je však pouze 15 – 20 % z toho co se vstřebá z kvercetin-4'-O-glukosidu (Graefe *et al.* 2001; Hollman *et al.* 1999). Uvolněné cukry pak podporují další metabolismus, slouží totiž jako zdroj uhlíku stimulující růst bakteriální mikroflóry (Jaganath *et al.* 2009).

Kromě štěpení glykosidů existují také bakterie schopné štěpit i základní struktury flavonoidů. V případě kvercetinu bylo toto štěpení dokázáno u širokého spektra bakterií (Pediococcus Q-5, Streptococcus S-3, Bifidobacterium B-9, Bacteriodes JY-6, Clostridium perfringens, Bacteriodes fragilis). Výsledkem je celá řada jednoduchých fenolických kyselin (Jaganath *et al.* 2009; Kim *et al.* 1998; Peng *et al.* 2014).

Současné znalosti o metabolismu kvercetinu zejména ve vztahu k střevní mikroflóře jsou shrnuty v Obr. 8.



Obr. 8. Metabolismus kvercetinu. Schéma shrnuje potvrzené i domnělé metabolity kvercetinu tvořené lidskými enzymy (H), nebo střevní mikroflórou v tlustém střevě (B). Nález struktury v šedé barvě nebyl dosud potvrzen. Schéma bylo vytvořeno na základě shromážděných dat z různých článků (Braune *et al.* 2001; Graefe *et al.* 2001; Loke *et al.* 2008; Olthof *et al.* 2003; Rechner *et al.* 2004; Sawai *et al.* 1987; Serra *et al.* 2012; Schneider *et al.* 1999) a publikováno v Najmanova *et al.* (2016). Další konjugáty kvercetinu a jeho metylderivátů nejsou pro lepší přehlednost zobrazeny.

Eliminace

Polyfenoly a jejich metabolity jsou vylučovány močí nebo žlučí do stolice. Vylučování močí je jednou z možných cest odstranění isoflavonoidů, flavanonů a flavan-3-olů. Touto cestou se vyloučí ale jen malá část metabolitů se zachovalou flavonoidní strukturou (10%). Větší část se vylučuje hepatobiliární cestou do duodena a takto vyloučené metabolity mohou být znovu zpracovány střevní mikroflórou a opět vstřebány. Tímto způsobem tak může být prodlouženo působení polyfenolických látek na organismus (Grassi *et al.* 2009). Nicméně bakterie mohou také rozštěpit základní jádro flavonoidu a dávají tak vzniknou širokému spektru fenolických kyselin náchylných k dalším reakcím, jako jsou β -oxidace, demethylace a dehydroxylace. Po absorpci jsou tyto malé fenolické kyseliny nebo jejich konjugáty vyloučeny močí (Hollman a Katan 1997).

1.3.2 Antihypertenzní působení kvercetinu

Kvercetin vykazuje *in vitro* podmínkách vasorelaxační působení na cévy jak koronárního, tak i systémového řečiště (Ajay *et al.* 2003; Perez-Vizcaino *et al.* 2002). V *in vivo* podmínkách snižuje krevní tlak, potlačuje remodelaci srdce, redukuje endoteliální dysfunkci a remodelaci cév u spontánně hypertenzních potkaních modelů (Duarte *et al.* 2001a; Garcia-Saura *et al.* 2005).

Vasodilatační účinky kvercetinu byly také potvrzeny i v několika *in vivo* studiích. Ta první byla provedena na spontánně hypertenzních potkanech (SHR), kterým bylo po pět týdnů podáváno 10 mg/kg kvercetinu. U SHR došlo k významnému poklesu systolického (18%), diastolického (23%) a středního (21%) arteriálního tlaku, u normotenzních kontrol byl tlak krve nezměněn (Duarte *et al.* 2001b).

Podobná studie byla provedena i na 2K1C Goldblatt hypertenzních potkanech (GB), kteří mají částečnou obstrukci jedné z ledvinných arterií a vyvíjí se u nich hypertenze podobná lidské renovaskulární hypertenzi, která je spojená se zvýšenou aktivací renin-angiotensinového systému. Těmto potkanům bylo po dobu pěti týdnů podáváno 10 mg/kg kvercetinu. Od druhého týdne začalo postupné snižování systolického krevního tlaku. Na konci testovacího období byl tlak snížen o 50%. Kvercetin také inhiboval remodelaci srdce, a i když neměl vliv na rozvoj renální hypertrofie, pomohl aspoň zlepšit proteinurii v porovnání s kontrolními GB (Garcia-Saura *et al.* 2005).

Kromě dlouhodobého podávání kvercetinu byly zjišťovány i jeho účinky na kardiovaskulární systém při jednorázovém podání 10 mg/kg gastrickou sondou SHR potkanům. K signifikantnímu poklesu středního tlaku krve a srdeční frekvence došlo již za 2,5 h a maxima dosáhl za 6 h, kdy se snížil krevní tlak o 30%. V případě, že potkanům byl i.p.

podáván denně 3 dny před podáním kvercetinů specifický inhibitor β -glukuronidázy, nebyl zaznamenán pokles tlaku ani srdeční frekvence (Galindo *et al.* 2012b).

Zajímavých výsledků bylo dosaženo při porovnání pětítýdenního podávání kvercetinů (10 mg/kg) p.o. gastrickou sondou a i.p. u SHR. U potkanů, kterým byl kvercetin podáván p.o. v jedné denní dávce, došlo k signifikantnímu poklesu systolického tlaku už od prvního týdne podávání a k poklesu srdeční frekvence po druhém týdnu. U potkanů s i.p. podávaným kvercetinem došlo ke snížení systolického krevního tlaku a srdeční frekvence až v průběhu posledních dvou týdnů podávání. Navíc byly i rozdíly ve váze levé srdeční komory a ledvin ve srovnání s kontrolní skupinou (Galindo *et al.* 2012a).

Kvercetin aplikovaný intraperitoneálně je vstřebáván portální žilou a ihned podstupuje metabolizaci v játrech, což vysvětluje nález různých konjugátů kvercetinů v plasmě po 2 a 8 hodinách od podání a v koncentraci, která je několikanásobně vyšší než u kvercetinů podaného orálně. Kvercetin podaný orálně se může částečně vstřebat již v tenkém střevě, kde však podstoupí metylaci a/nebo konjugační reakce a proto jsou nízké koncentrace methylovaných a glukuronidovaných metabolitů nalezeny již po dvou hodinách v plasmě. Následně dochází k jeho degradaci v tlustém střevě za vzniku fenolických kyselin, které se dále vstřebávají (Galindo *et al.* 2012a).

Dokonce proběhla i dvojitě zaslepená klinická studie (6 žen), kterým byla podána kapsle obsahující placebo, 200 nebo 400 mg tři po sobě jdoucí týdny. Po dvou hodinách byl v plasmě detekován kvercetin-3-O glukuronid v koncentraci 0,4 a 1 μ M a menší koncentrace isorhamnetinu (0,008 a 0,035 μ M) a kvercetinů (0,043 a 0,031 μ M). Změna krevního tlaku nebyla detekována po dvou a ani po pěti hodinách od podání. O jistém vasorelaxačním účinku tak vypovídá jen rozšíření brachiálních arterií (Perez *et al.* 2014).

Mechanismus antihypertenzního působení kvercetinu

In vitro experimenty zaměřené na vasodilatační působení kvercetinu a některých jeho metabolitů byly provedeny na různých typech izolovaných cév. Většinou se jednalo o hrudní aorty, mesenterické, renální nebo femorální arterie potkanů, koronární cévy prasat, nebo myší aorty. Bylo prokázáno, že kvercetin je schopen vyvolat relaxaci u cév kontrahovaných agonisty α_1 receptorů (fenylefrinem a noradrenalinem), vysokou koncentrací K^+ iontů (60-80 mM), nebo angiotensinem II, a to závisle na koncentraci. Dále byl sledován vliv dlouhodobějšího působení kvercetinu na vyvolání kontrakce již zmíněnými látkami, nebo naopak relaxace kontrahovaných cév acetylcholinem, či nitroprusidem sodným (Ajay *et al.* 2003; Herrera *et al.* 1996; Chen a Pace-Asciak 1996; Li *et al.* 2012; Machha a Mustafa 2005; Perez-Vizcaino *et al.* 2009).

Přesný mechanismus účinku vasodilatačního působení kvercetinu nebyl dosud odhalen. Studie, které se touto problematikou zabývaly, přinesly rozporuplné poznatky a poukazují na několik možných mechanismů vasodilatačního působení. Může docházet k uvolnění vasodilatačních působků, oxidu dusnatého a prostacyklinu z endotelu cév, což by poukazovalo na vasodilatační účinky závislé na endotelu. Na druhou stranu je-li látka schopna vyvolat dilataci u cévy, kde byl endotel odstraněn, poukazuje to na účinky na endotelu nezávislé. To je i případ kvercetinu, ale dostupné údaje nejsou jednotné.

Molekulární mechanismus relaxace na endotelu závislé zahrnuje navýšení aktivity endotelové NO-syntázy (eNOS) a tím nárůst produkce NO což vede k relaxaci cév. Může také docházet ke zvýšenému uvolňování prostacyklinu z endotelu. Tyto vasodilatační účinky mohou být zablokovány přidáním vhodného inhibitoru. Pro studium mechanismu účinku kvercetinu se setkáváme v mnoha člancích s použitím inhibitorů inducibilní NO-syntázy a to nejčastěji s L-NAME (N^G -nitro-L-arginine methyl ester) (100 μ M) nebo L-NNA (N^O -nitro-L-arginin) (1 μ M). V případě preinkubace cévy s tímto typem inhibitorů a kvercetinu, došlo

k snížení kontraktility cévy (Chen a Pace-Asciak 1996; Khoo *et al.* 2010). K ověření vlivu kvercetinu na uvolňování prostacyklinu se používá inhibitor cyklooxygenázy indometacin v koncentraci 10 μM . Výsledkem je opět pokles kontraktility (Ajay *et al.* 2003).

Detailněji byl mechanismus působení popsán s využitím endotelových buněk izolovaných z aorty skotu. Po přidání 50 μM kvercetinu došlo k aktivaci endotelové NO syntázy prostřednictvím fosforylace Ser¹¹⁷⁹. K fosforylaci na Ser¹¹⁶ nebo Thr⁴⁹⁷ nedošlo. Aktivace eNOS kvercetinu je závislá na dávce a probíhá velmi rychle. K největší fosforylaci dochází již za 5 minut od podání kvercetinu (Khoo *et al.* 2010; Li *et al.* 2012). Za spuštění fosforylace eNOS je zodpovědná především aktivace protein kinázy A, k níž dochází již za 2 minuty od podání kvercetinu (Li *et al.* 2012). Kvercetinem stimulovaná fosforylace endotelové NO syntázy může být však blokována navýšením katalázové aktivity uvnitř buňky (Khoo *et al.* 2010).

Jak prokázaly některé studie, ani odstranění, či úmyslné poškození endotelu nevedlo zcela k potlačení vasorelaxačního účinku kvercetinu na kontrahované cévy. Musely však být použity vyšší koncentrace kvercetinu a relaxace probíhala pomaleji (Chen a Pace-Asciak 1996). Tyto výsledky ukazují, že vasorelaxace je způsobena u nižších koncentrací kvercetinu na endotelu závisle, ale při použití vyšších koncentrací na endotelu nezávisle (Chan *et al.* 2000).

Kromě zvýšeného uvolňování vasorelaxačních působků, je kvercetin schopen přímo ovlivňovat kontrakci. Kontrakce vyvolaná agonisty α_1 -receptorů má dvě fáze. Při aktivaci receptoru jednak dojde k uvolnění Ca^{2+} iontů z endoplasmatického retikula do cytoplasmy (iniciační fáze) a také k otevření napětově řízených vápenatých kanálů typu L a influxu Ca^{2+} iontů do buňky (tzv. udržovací fáze). Vápenaté ionty se následně vážou na kalmodulin a vzniklý komplex aktivuje lehkoreťezovou myosinkinázu, která fosforyluje lehké řetězce

myosinu a umožňuje kontrakci hladkosvalové buňky cévní stěny díky interakci mezi vlákny myosinu a aktinu (Webb 2003).

Pro možné sledování vlivu flavonoidu na uvolnění vápenatých iontů z endoplasmatického retikula, bylo nutné omezit vliv extracelulárních Ca^{2+} iontů. Do Krebsova roztoku byla přidána kyselina ethylenglykol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina (EGTA, v koncentraci 0,2 mM) pro chelataci volných iontů vápníku. Inkubace cévy v prostředí s flavonoidem a následné vyvolání kontrakce agonistou α_1 receptoru vedlo k snížení schopnosti cévy kontrahovat (Chan *et al.* 2000).

Vliv kvercetinu na vstup extracelulárního vápníku byl zkoumán opět v Krebsově roztoku, bez obsahu Ca^{2+} iontů. Po inkubaci s flavonoidem byl roztok vyměněn za roztok bez Ca^{2+} iontů, zato s vysokou koncentrací K^+ iontů, které způsobují polarizaci membrány a napět'ově řízené Ca^{2+} kanály se otevřou. Přidání Ca^{2+} tak mělo vyvolat kontrakci, ovšem přítomnost flavonoidu inhibovala vstup vápníku přes napět'ově řízené kanály, a tak i kontrakci (Chan *et al.* 2000).

Dalším možným mechanismem účinku kvercetinu je inhibice protein kinázy C a inhibice lehkoreťezcové myosin kinázy (Herrera *et al.* 1996; Perez-Vizcaino *et al.* 2009). Pravděpodobný je také inhibiční účinek kvercetinu na fosfodiesterázy cyklických nukleotidů cAMP a cGMP (Duarte *et al.* 1993; Herrera *et al.* 1996).

1.3.3 Metabolity kvercetinu a jejich vliv na hladký cévní sval

Jak již bylo zmíněno výše, k prvnímu metabolismu dochází již v buňkách tenkého střeva, následuje metabolizace v játrech. Dochází ke konjugačním reakcím, jejichž výsledkem jsou glukuronidy, methylderiváty a sulfáty kvercetinu.

Methylderiváty kvercetinu tvořeny u lidí nebo na savcích modelech jsou isorhamnetin (3'-methoxy-3, 5, 7, 4'-tetrahydroflavon) a tamarixetin (4'-methoxy-3, 5, 7, 3'-tetrahydroflavon). U lidí dochází především metylaci 3'-OH skupiny a tedy přednostní tvorbě isorhamnetinu (Morand *et al.* 2000). Vasorelaxační účinky isorhamnetinu a tamarixetinu jsou velmi podobné kvercetinu, a proto mohou být aspoň částečně zodpovědné za antihypertenzní účinky přisuzované kvercetinu (Perez-Vizcaino *et al.* 2002).

Při *in vitro* pokusech působil isorhamnetin nezávisle na endotelu, neboť ani jeho odstranění nebo použití inhibitoru cyklooxygenázy (indometacinu) neovlivnilo relaxaci. Účinnost tohoto metabolitu byla velmi podobná u cév kontrahovaných noradrenalinem, KCl, U46619 nebo phorbolem 12-myristát-13-acetátem. Pravděpodobným mechanismem je tedy inhibice proteinkinázy C nebo jiné proteinkinázy regulující relaxaci hladkého svalstva. Zdá se také, že neovlivňuje signální dráhy guanylcyklázy, adenylátcyklázy, nebo Na/K ATPázy a zřejmě ani neinteraguje s receptory pro endotelin-1 (Ibarra *et al.* 2003; Ibarra *et al.* 2002). Ačkoli kvercetin, isorhamnetin i tamarixetin vykazují silnější vasorelaxační účinek na odporových cévách (mesenterická a kyčelní arterie) než pružnickových (hrudní a abdominální aorta), selektivita byla signifikantní pouze pro isorhamnetin (Perez-Vizcaino *et al.* 2002).

Kvercetin a jeho methylderiváty podstupují rychlou konjugaci s kyselinou glukuronovou a sulfátem. Nejčastěji detekovanými konjugáty jsou kvercetin-3-O-

glukuronid, kvercetin-3'-sulfát a isorhamnetin-3-glukuronid (Manach *et al.* 1998). Těmto metabolitů byl přikládán vasorelaxační účinek, to se však při *in vitro* studiích neprokázalo. Žádný z těchto glukuronidů nedokázal vyvolat relaxaci na potkaních hrudních aortách kontrahovaných fenylefrinem (0,1 μM). Stejně tak neovlivnili relaxaci navozenou NO za fyziologických podmínek (Lodi *et al.* 2009).

Protože aglykony kvercetin a jeho metylderivát prokazatelně vykazují vasorelaxační účinky, ale jejich glukuronidy nikoli, bylo zkoumáno, zda mohou být konjugáty v cévách dekonjugovány. *In vitro* experimenty probíhaly na mesenterických cévách inkubovaných po 30 minut s kvercetin-3-O-glukuronidem (100 μM). Tato preinkubace však neměla vliv na následnou kontrakci navozenou fenylefrinem, zato při preinkubaci kvercetinem byla kontrakce silně inhibována. V případě delší preinkubace (180 min) vykazoval tento metabolit silný inhibiční efekt, zatímco v přítomnosti inhibitoru β glukuronidázy (D-sacharolakton, 300 μM) tento účinek nebyl nalezen. Autoři této publikace usuzují, že kvercetin-3-O-glukuronid je v mesenteriu enzymaticky dekonjugován a vzniklý kvercetin pak vykazuje vasorelaxační účinky. Svůj předpoklad si také ověřili při i.v. podání kvercetin-3-O-glukuronidu (1 mg/kg) potkanům v celkové anestezii, kdy byl pozorován pokles krevního tlaku po 60 minutě od podání, pokles se zastavil až po 100 minutách (Menendez *et al.* 2011).

Obdobné byly pozorovány i výsledky ve studii Galindo *et al.* (2012), kde porovnávali vasodilatační působení všech tří glukuronidů nejen kvercetinu ale i jeho metylderivátů na SHR. Isorhamnetin-3'-glukuronid stejně jako kvercetin-3-O-glukuronid vykazoval v dávce 1 mg/kg antihypertenzní účinky po i.v. podání, které byly signifikantní až po delší době od aplikace (po 1. a 2. hodině), a maximálních hodnot poklesu krevního tlaku bylo dosaženo až ve 3. hodině od podání ($11,4 \pm 1,8\%$ pro glukuronid isorhamnetinu a $14,9 \pm 1,8\%$ pro glukuronid kvercetinu). Po i.v. aplikaci 1 mg/kg posledně jmenovaného byla v krvi detekována jeho koncentrace dosahující koncentraci přibližně 23 μM a velmi rychle klesala.

Po půl hodině byl v plasmě detekován už jen aglykon kvercetin a glukuronid isorhamnetinu (Galindo *et al.* 2012b)

U ostatních metabolitů, zejména těch, kteří jsou tvořeny bakteriální mikroflórou v tlustém střevě, nebyla do zahájení této studie testována jejich vasorelaxační aktivita.

2. Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo sledování vlivu polyfenolických látek na hladký cévní sval *in vivo* a *in vitro* podmínkách. Jako modelové látky byly vybrány flavonoidy a kumariny.

Specifickými cíli této práce bylo:

- a) Zjištění vlivu kvercetinu, jeho metabolitů tvořených lidskými enzymy a lidskou mikroflórou na hladký cévní sval *in vitro* a u účinných látek i *in vivo*
- b) Porovnání účinků všech známých metabolitů flavonoidů tvořených lidskou mikroflórou na hladký cévní sval *in vitro* a u účinných látek i *in vivo*
- c) Zjištění mechanismů účinku účinných metabolitů kvercetinu vedoucích ke snížení arteriálního krevního tlaku
- d) Analýza současných znalostí týkajících se vlivu kumarinů na hladký cévní sval v *in vitro* a *in vivo* podmínkách

Bod d) byl splněn sepsáním revíální publikace: Cardiovascular Effects of Coumarins Besides their Antioxidant Activity – viz str. 132

Cíle a-c si vyžádaly komplexnější experimenty a pro lepší přehlednost byly rozděleny mezi body 1-8 (viz také metodická část a kapitoly 3.3.1-3.3.8). Cíle a) se týkají body 1, 3, 4, 5, 6 a 8. Cíle b) bod 2 a 6 a cíle c) bod 7.

1. *In vitro* screening vasoaktivních vlastností kvercetinu a jeho známých metabolitů na potkaní aortě
2. *In vitro* screening vasoaktivních vlastností dalších metabolitů flavonoidů na potkaní aortě
3. Porovnání účinků tří účinných metabolitů kvercetinu *in vitro* na potkaní *arteria mesenterica*

4. *In vivo* účinky různých dávek účinných metabolitů kvercetinů na krevní tlak
5. *In vivo* účinky infúze účinných metabolitů kvercetinů na krevní tlak (simulace pomalé absorpce těchto látek z GITu)
6. *In vivo* analýza krevní tlak snižujícího vlivu účinných metabolitů
 - 6.1 Možné ovlivnění srdeční kontraktility a relaxace
 - 6.2 Ovlivnění účinků noradrenalinu
7. Zjištění mechanismu účinku 3 účinných metabolitů v aortě potkana
8. Ověření účinku kvercetinů a jeho metabolitu kvercetin-3-O-glukuronidu na potkanech

3. Materiál a metodika

3.1 Zvířata

Samci kmene Wistar:Han byli pořízeni v MediTox (Česká republika), zatímco spontánně hypertenzní potkani (spontaneously hypertensive rats, SHR) byly zakoupeni z Charles River (USA) nebo z Akademie věd (Česká republika). Potkani byli drženi ve viváriu Farmaceutické fakulty v konstantních teplotních (23 – 25°C) a světelných (12-h střídání den/noc) podmínkách. Měli neomezený přístup k potravě i vodě. Tato studie (reg. č. MSMT-7041/2014-10) byla schválena Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Univerzity Karlovy, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

3.2 Chemikálie

Flavonoidy a testované metabolity

Ze Sigma-Aldrich (Německo) byly zakoupeny následující

- 2,4-dihydroxyacetofenon
- 2,4-dihydroxybenzoová
- 2-hydroxyfenyloctová kyselina
- 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina
- 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina
- 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (3,4-DHPA)
- 3,4-dihydroxyhydroskořicová kyselina/3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina/
- 3-fenylpropionová kyselina
- 3-hydroxy-4-methoxy-fenyloctová kyselina
- 3-hydroxybenzová kyselina

- 4-hydroxybenzoová
- 4-hydroxyfenyloctová kyselina
- 4-methoxysalicylová kyselina
- 4-methylcatechol (3,4-dihydroxytoluen)
 - benzoová kyselina
 - floroglucinol
 - hippurová kyselina
 - homovanilinová kyselina
 - kvercetin
 - pyrogallol
 - resorcinol

z Extrasynthese (Francie)

- 3-kumarová kyselina
- kvercetin-3-O-glukuronid
- isorhamnetin
- tamarixetin

z Toronto Research Chemicals (Kanada)

- 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (3-HPPA)
- 3-hydroxyfenyloctová kyselina

Preparát kvercetinu s polymerem určený k i.v. aplikaci i kontrolní polymer byly připraveny na katedře Chemie a farmacie University v Sassari, Itálie (Assoc. Prof. Elisabetta Gavini, Department of Chemistry and Pharmacy, Università degli Studi di Sassari). Jeho přesné složení není možné v současné době zveřejnit, tyto výsledky totiž nebyly zatím publikovány.

Další reagensie

Na přípravu Krebsova roztoku byly použity chemikálie od firmy Penta (Česká republika) a to jmenovitě chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, síran hořečnatý, dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenuhličitan sodný a glukóza.

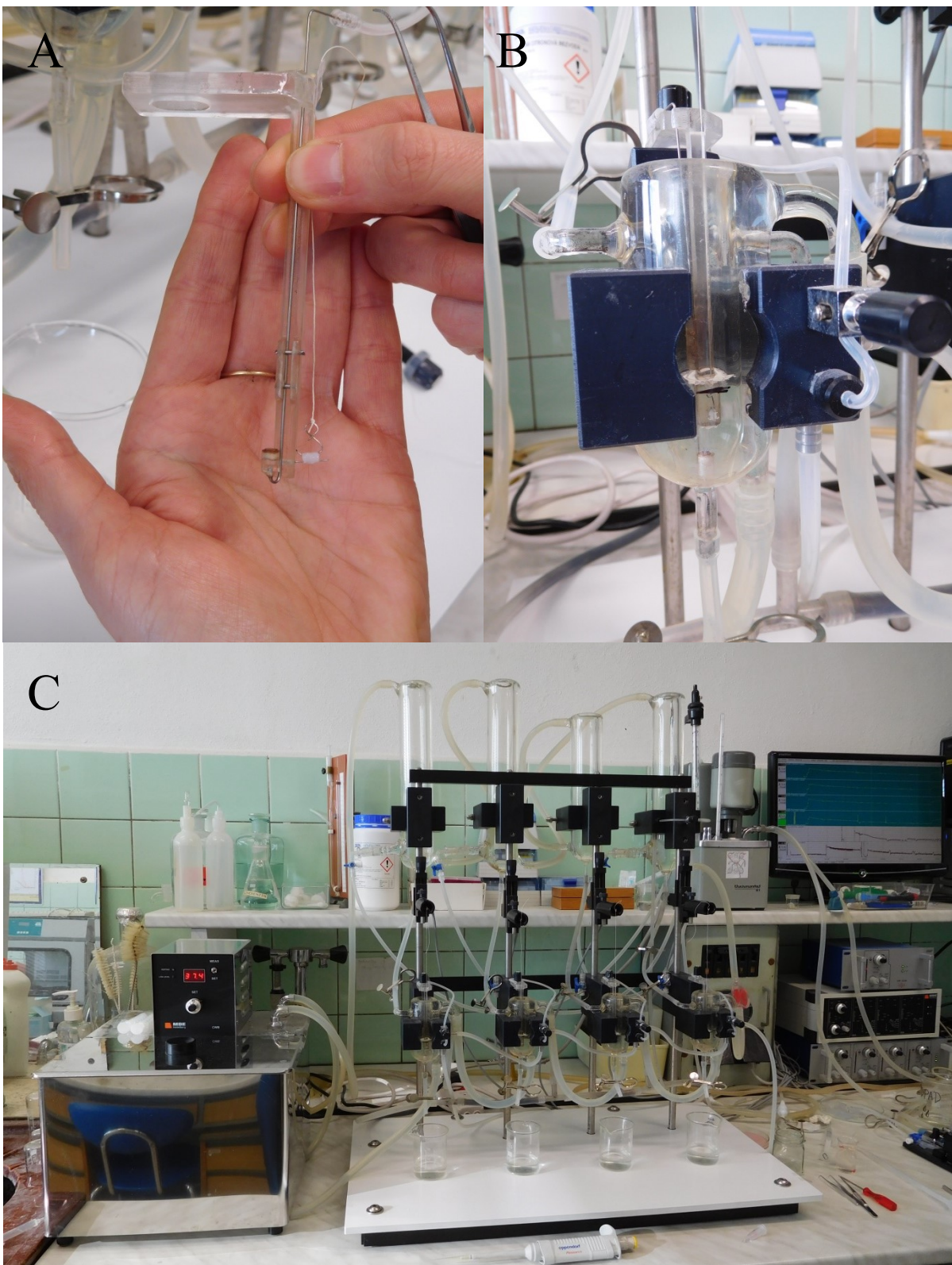
Noradrenalin, acetylcholin, atropin, L-N^o-nitroarginin methyl ester (L-NAME), DMSO, pentobarbital a urethan byly pořízeny od společnosti Sigma-Aldrich (Německo).

3.3 Metodika

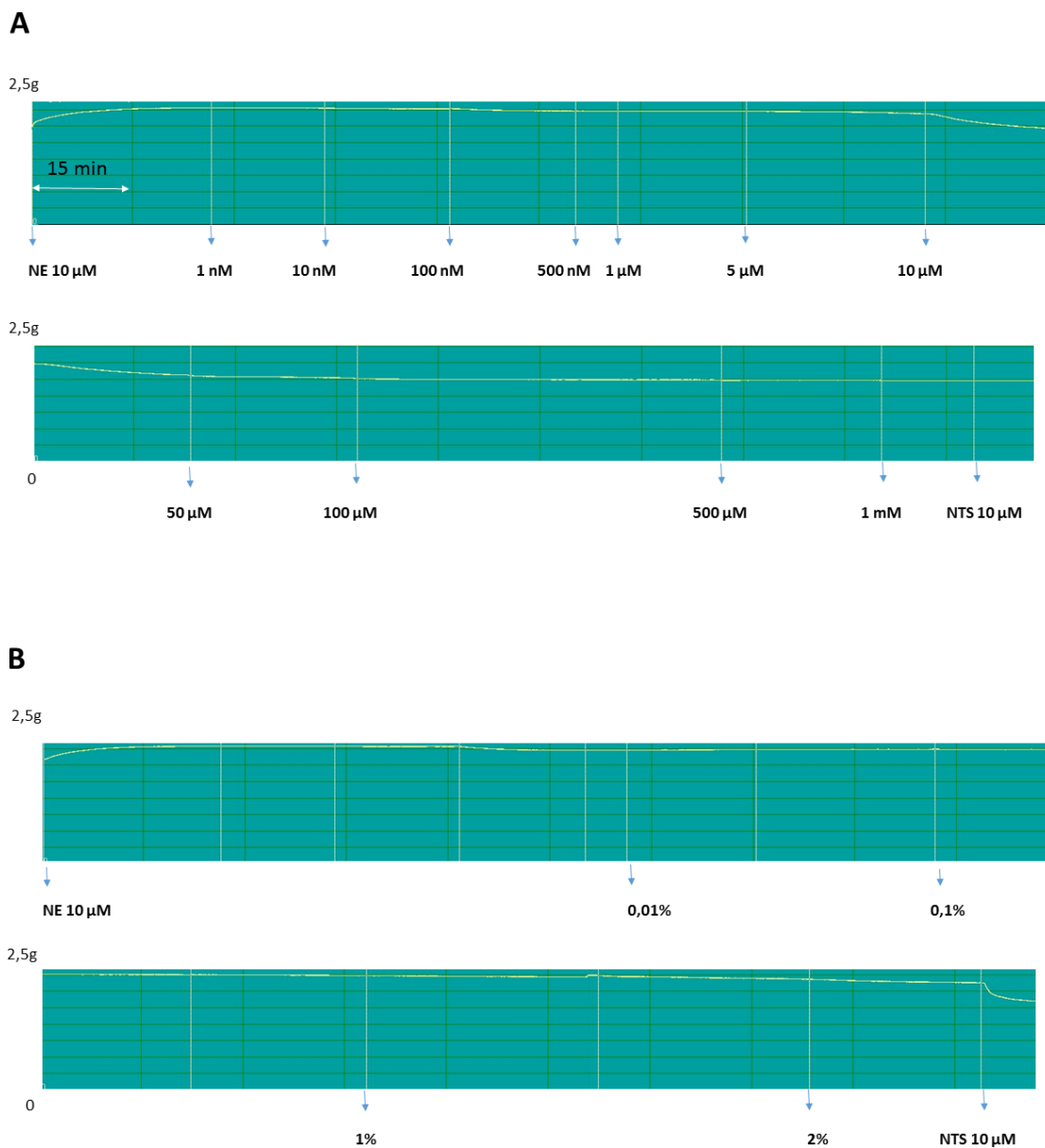
3.3.1 Bod 1 - *In vitro* screening vasoaktivních vlastností kvercetinu a jeho známých metabolitů na potkaní aortě

Potkani kmene Wistar:Han byli uvedeni do celkové anestezie i.p. podaným uretanem (1,2 g/kg) a vykrvení. Hrudní část aorty byla vyjmuta a umístěna na Petriho misku s Krebsovým roztokem o pH 7,4 (135 mmol/l NaCl, 5,0 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l CaCl₂, 1,3 mmol/l MgSO₄, 1,2 mmol/l KH₂PO₄, 20 mmol/l NaHCO₃ a 10 mmol/l glukózy). Po odstranění okolní pojivové a tukové tkáně aorty, byla očištěná céva nastříhána na 4 kroužky, alespoň 3 - 4 mm dlouhé. Takto připravené preparáty byly zavěšeny na nosič tkáně a háček spojený převodníkem s počítačem vybaveným S.P.E.L. Advanced Kymograph Software (Experimetria Ltd, Maďarsko, Obr. 9). Háčky s cévami byly ponořeny do vodních lázní s 5 ml Krebsova roztoku, zahříváním na 37°C a okysličovaným (95% O₂ / 5% CO₂). Aortální kroužky byly nataženy na 2 g a stabilizovány po dobu 45 minut. V průběhu stabilizace byl Krebsův roztok měněn vždy po deseti minutách. Následně bylo přidáno 50 μl noradrenalinu o koncentraci 10 μM (finální koncentrace v lázni byla 0,1 μM) a pozorována kontrakce, která se stabilizovala přibližně za 30 minut. Pro ověření intaktnosti endotelu bylo přidáno do vodní lázně 50 μl

acetylcholinu o koncentraci 10 μM (finální koncentrace v lázni 0,1 μM). V případě, že byl endotel neporušený, došlo k relaxaci cévy. Krebsův roztok byl poté několikrát vyměněn, po stabilizaci cévy byl opět přidán NA (50 μl , 10 μM) a čekalo se na dosažení maximální kontrakce. Flavonoid nebo jeho metabolity byly rozpuštěny v DMSO a přidávány kumulativně ve vzrůstajících koncentracích (10^{-7} – 10^{-1} M) do vodní lázně, aby byly dosaženy finální koncentrace testované látky od 10^{-9} do 10^{-3} M. Maximální koncentrace DMSO v lázni nepřekročila v případě účinných látek 0,1%. Pro změření vasorelaxačních účinků slabších látek byly maximální dosažená koncentrace DMSO 2%. Před ukončením experimentu byl do vodní lázně přidán nitroprusid sodný (50 μl , 10 μM) pro vyvolání maximální relaxace. Změna isotonického napětí cévy byla měřena za pomoci výše zmíněného softwaru S.P.E.L. Advanced Kymograph (příklad viz Obr. 10).



Obr. 9. Ukázka zavěšení aortálního kroužku (A) a jeho upevnění ve vodní lázni (B). Celkový vzhled aparatury (uprostřed) s termostatem (vlevo), zesilovačem a PC vybavením (vpravo) (C).



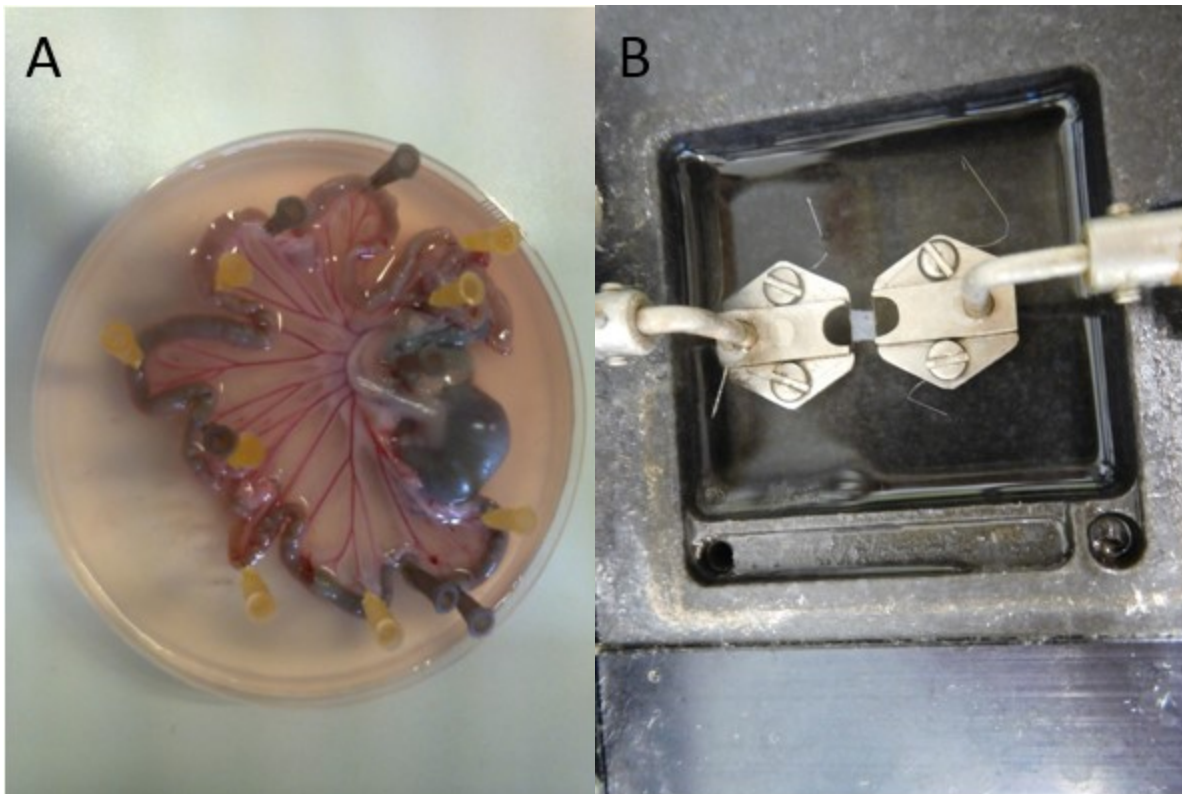
Obr. 10. Originální záznam experimentu zobrazující vasorelaxační potenciál jednoho z účinných metabolitů (3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny) **(A)** a rozpouštědla (DMSO v Krebsově roztoku) **(B)** na kroužku potkaní aorty. NTS – nitroprusid sodný, NE – noradrenalin. Obrázek byl převzat z publikace Najmanova *et al.* (2016)

3.3.2 Bod 2 - *In vitro* screening vasoaktivních vlastností dalších metabolitů flavonoidů na potkaní aortě

Postup byl stejný jako v předchozím případě. Testovány byly: kyselina benzoová, 3-hydroxy-4-methoxyfenyloctová kyselina, 2,4-dihydroxybenzoová, 4-hydroxybenzoová, hippurová kyselina, 2,4-dihydroxyacetofenon, resorcinol, pyrogalol, 3-(3,4-dihydroxyfenyl)propionová kyselina, 4-metoxysalicylová kyselina. Rozpouštědlem byl stejně jako v předchozích případech DMSO.

3.3.3 Bod 3 - Porovnání účinků tří účinných metabolitů kvercetinu *in vitro* na potkaní *arteria mesenterica*

Po vykrvení potkana byla vyjmuta oblast mesenteria. Nejprve byla přetřata proximální část tenkého střeva v blízkosti pyloru a přetřaty byly i *arteria mesenterica superior* odstupující z aorty a portální žíla. Následně byla přerušena distální část sestupného tračníku, který bylo třeba ještě odstříhnout od zadní stěny břišní dutiny. Střeva byla vyňata i s oblastí mesenteria a ponořena do kádinky s Krebsovým roztokem a následně přesunuta na podložku Petriho misky naplněné Krebsovým roztokem. Střeva byla rozprostřena po obvodu misky a upevněna jehlami na podložku (Obr.11A). Primární mesenterická arterie byla očištěna od okolní tukové tkáně a následně vystřižena. Očištěná céva byla nastříhána na přibližně 2 mm dlouhé kroužky a upevněna do malé komůrky myografu (Small vessel myographic system, Experimetria Ltd, Maďarsko) za pomoci wolframových drátků (0,05 mm v průměru, Obr. 11B). Céva byla napnuta na 1 g a ponechala se stabilizovat v průběhu 20 minut. Krebsův roztok byl měněn každých 10 minut. Dále byl postup totožný s výše zmíněným bodem 1 (kapitola 3.3.1)



Obr. 11. Cévy mezenteria a upevnění *arteria mesenterica* do přístroje. Potkaní střeva jsou rozprostřena po obvodu misky, z nich odstupují sekundární mesenterické arterie, které se napojují na primární mesenterickou arterii obalenou tukovým polštářem (A). Upevnění mesenterického kroužku do myografu, za pomoci wolframových drátků (B).

3.3.4 Bod 4 - *In vivo* účinky různých dávek účinných metabolitů kvercetinu na krevní tlak

Samci potkanů kmene SHR byli uvedeni do celkové anestezie pentobarbitalem (50 mg/kg). Následně byla provedena kanylace levé kyčelní arterie (*arteria illiaca*), do které byl zaveden měřič tlaku (MLT0380/D, PowerLab, AdInstruments, Austrálie) naplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem (1%). Povrchová žíla levé dolní končetiny (*vena saphena*) byla kanylována a prováděla se do ní aplikace fyziologického roztoku a poté aplikace zvyšujících se jednotlivých dávek metabolitů rozpuštěných ve fyziologickém

roztoku. Podávanými dávkami byly 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg a 25 mg/kg. Po aplikaci fyziologického roztoku i jednotlivých dávek metabolitů, byla kanyla vždy propláchnuta 50 μ l heparinizovaného fyziologického roztoku (1%) a to do 15 sekund od ukončení aplikace. Mezi jednotlivými aplikacemi se čekalo tak dlouho, dokud nebyl krevní tlak ustálen po dobu 5 minut. Všechny roztoky aplikované do těla potkana byly zahřáty na tělesnou teplotu ve vodní lázni (37°C). Arteriální krevní tlak i srdeční frekvence byly měřeny a zaznamenány pomocí systému PowerLab (AdInstruments, Austrálie). Měření probíhala na 4-7 potkanech pro každou látku.

3.3.5 Bod 5 - *In vivo* účinky infúze účinným metabolity kvercetinu na krevní tlak (simulace pomalé absorpce těchto látek z GITu)

Napodobení pomalé kontinuální absorpce účinných metabolitů kvercetinu z trávicího traktu bylo testováno na SHR pomocí pomalé intravenózní infúze. Potkanům SHR byl stejně jako v předchozím pokuse zaveden do levé kyčelní arterie měřič tlaku a do levé *vena saphena* byla zavedena kanyla pro aplikaci roztoků. Roztoky se aplikovaly pomocí infuzní pumpy “Genie” (Kentsyringe pump, KentScientificCorporation, USA). Nejprve bylo aplikováno 0,25 ml fyziologického roztoku v průběhu 5 minut a po proplachu kanyly 50 μ l heparinizovaného fyziologického roztoku a stabilizaci tlaku se začalo s aplikací účinných látek a to v dávkách 0,25 mg/kg/50 μ l/min, 1 mg/kg/50 μ l/min a 5 mg/kg/50 μ l/min v průběhu pěti minut. Mezi jednotlivými dávkami bylo opět čekáno na stabilizaci hemodynamických parametrů, které musely být stabilní po dobu 5 minut před aplikací další infúze. Měření probíhala na 4-6 potkanech pro každou látku.

3.3.6 Bod 6 - *In vivo* analýza krevní tlak snižujícího vlivu účinných metabolitů

Sledování vlivu testovaných látek na srdeční kontraktilitu a relaxaci

Zvířata, anestezie a příprava měření

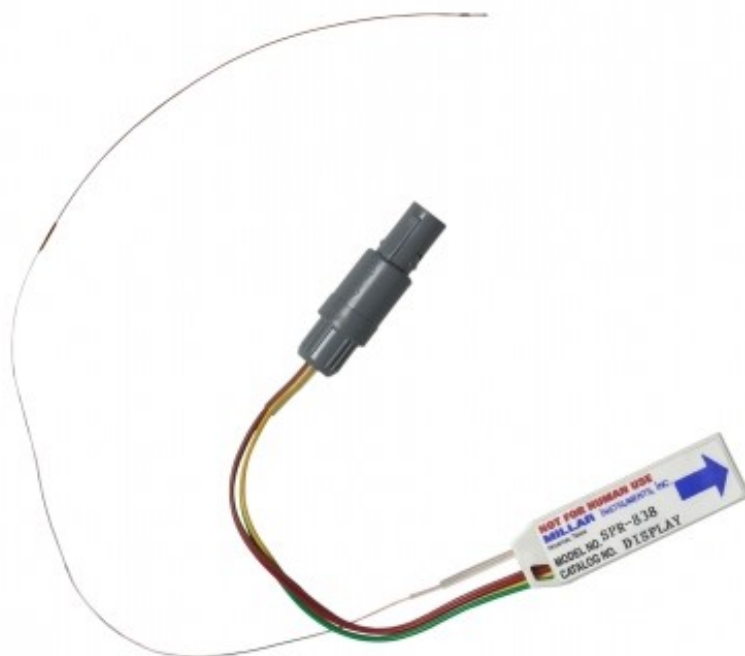
13 potkanů Wistar:Han bylo nejdříve anestezováno urtehanem (1.2 g/kg i.p.). Podobně jako v předchozích postupech byla nejdříve vypreparována *arteria illiaca communis* a spojena s tlakovým převodníkem pro měření krevního tlaku. V dalším kroku byla vypreparována část pravé společné karotidy (*arteria carotis communis*) a byl do ní zaveden tlak-objem měřící katetr (Millar pressure-volume-catheter SPR-838 2F, 4E, 9 mm; Millar Instruments Inc., USA, Obr. 12). Katetr byl za sledování záznamu zaveden až do levé komory (Obr. 13). Správnost zavedení byla ověřena podle záznamu (viz Obr. 14). Dalším krokem bylo zavedení jehly do *vena saphena dextra* a nakonec byly připojeny EKG jehel pro svod II. Poté bylo zvíře ponecháno 15 minut, aby se stabilizovaly hemodynamické parametry. Po tomto období byla nejdříve provedena kalibrace měření objemu. Přístroj totiž měří objem nejdříve jako napětí a převádí je na tzv. relativní objemové jednotky, které je nutné převést na skutečný objem krve v objemových jednotkách (μl) dvojitou kalibrací. První kalibrace je nutná k odfiltrování elektrického pole okolních struktur (např. pravé komory, plic). Zahrnuje podání 20 μl 25% w/w roztoku chloridu sodného s 900 IU/ml heparinu. Podáním tohoto hypertonického roztoku se krátkodobě změní elektrické vlastnosti krve a umožní se tak odečtení intenzity elektrického pole, která nesouvisí s krví. Detailní postup kalibrace prováděný při našich experimentech, včetně jeho zdůvodnění, byl publikován naší skupinou v práci (Filipsky *et al.* 2012). Druhá kalibrace se provádí na konci experimentu a zahrnuje prostý převod relativních objemových jednotek na μl (viz Obr. 15).

Vlastní měření

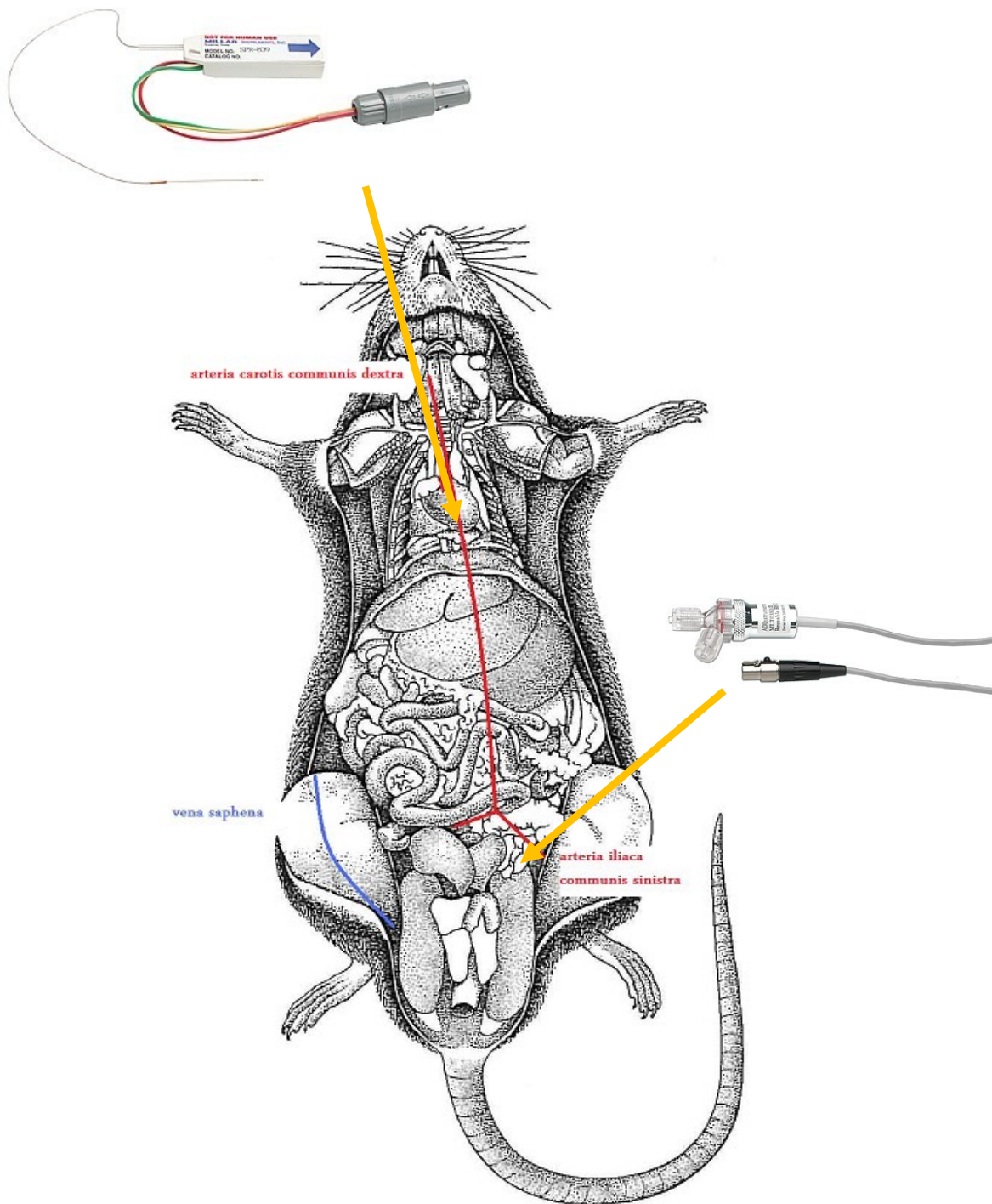
Po ukončení objemové kalibrace se zvíře nechá po dobu 5 minut bez zásahů, poté se postupně aplikoval jehlou do vena saphena nejdříve fyziologický roztok a poté testované látky v koncentracích jako v předchozím experimentu, tj. od 0.2 mg/kg do 25 mg/kg. Další dávka byla vždy podána až poté, co byl hemodynamický záznam 5 minut stabilní. Po poslední dávce byl ještě odebrán cca 1 ml krve ze sestupné aorty na kalibraci (viz výše). Experiment byl ukončen aplikací 1 ml 1 M vodného roztoku KCl do *vena saphena*.

Vyhodnocení

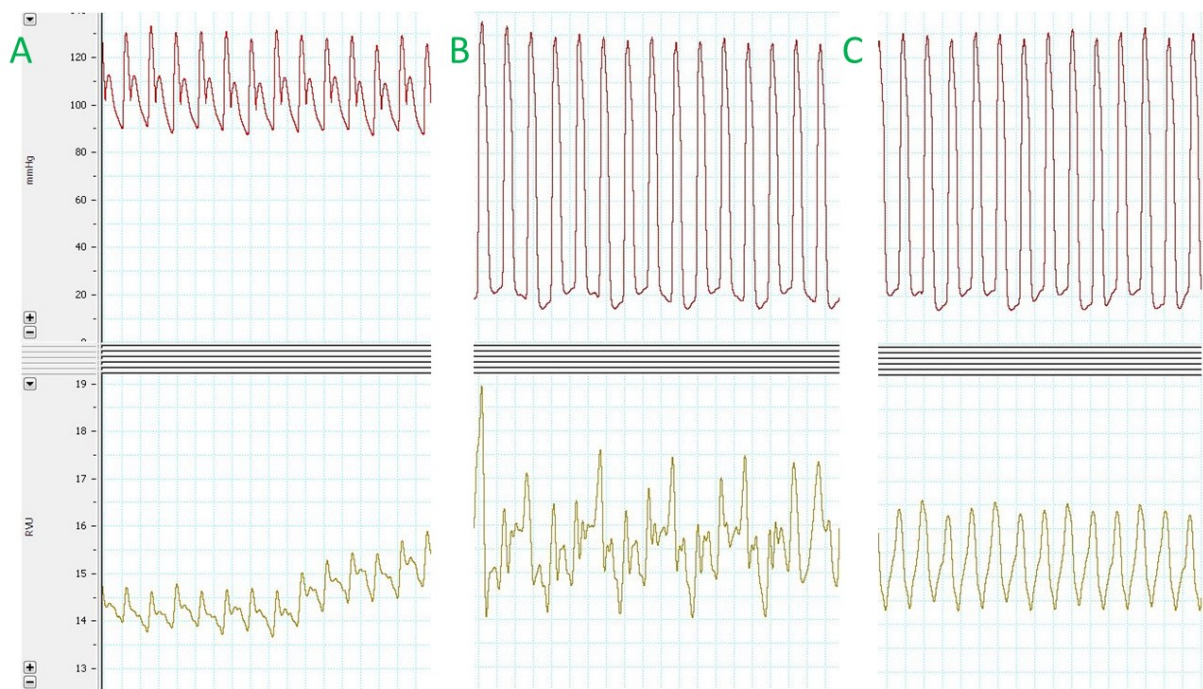
Vyhodnocení maximálních a minimálních tlaků v komoře, tepového objemu i parametrů kontraktility a relaxace bylo provedeno pomocí standardních postupů v programu PVAN software version 3.6 (Millar Instruments). Výpočet parametru τ proběhl pomocí Weissova postupu (Weiss *et al.* 1976).



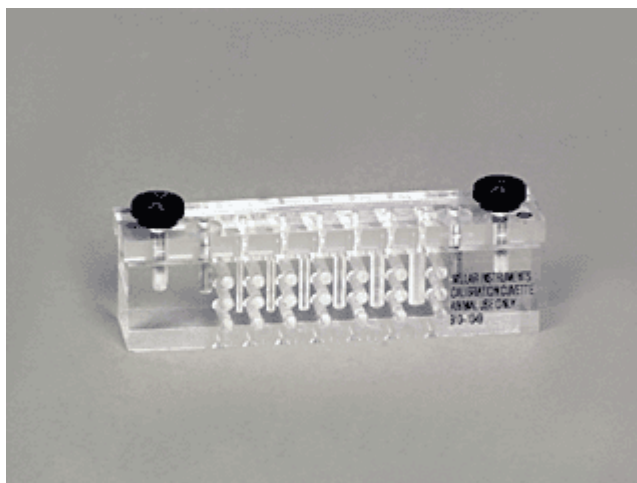
Obr. 12. Tlakově-objemový katetr SPR-838. Obrázek byl převzat z www.millar.com (<http://millar.com/products/research/pressure-volume/pressure-volume-catheters/spr-838>).



Obr. 13. Shrnutí experimentu pro zjištění vlivu na srdeční kontrakci a relaxaci. Zobrazení zavedení tlak-objem měřícího katetru do levé komory přes *arteria carotis communis*, tlakového převodníku do *arteria iliaca communis sinistra* a *vena saphena* pro účely kalibrace a aplikace jednotlivých dávek.



Obr. 14. Zavádění katedru do levé potkaní komory. Horní záznamy jsou tlakové křivky (mmHg), dolní záznam objemové křivky v relativních objemových jednotkách (relative volume units, RVU). Katetr nejdříve prochází *arteria carotis communis* a aortální obloukem (A, tlakový záznam ukazuje arteriální krevní tlak, systolický tlak 130 mmHg a diastolický 90 mmHg), jakmile projde aortální chlopní, diastolický tlak okamžitě poklesne téměř k 0 mmHg (B, tlak v komoře na konci fáze isovolumické relaxace) zatímco systolická hodnota se nemění. Objemový záznam je ale nutné ještě drobným posunem katetru doladit, až se objeví objemová křivka (viz část C).



Obr. 15. Kalibrační set pro převod relativních objemových jednotek na μl . Do malých prostor s přesně známým objemem v kalibračním setu se napipetuje krev, poté se do nich postupně zavede tlakově-objemový katetr a změří se záznam. Obrázek byl převzat z www.millar.com

(http://millar.com/mpvs_training_cd/FlashHelp/operation/volume_cuvette_calibration.htm).

Ovlivnění účinků noradrenalinu

15 samců potkanů kmene Wistar:Han bylo anestetováno uretanem (1,2 g/kg). Následně byla opět provedena kanylace levé kyčelní arterie, do které byl zaveden tlakový převodník MLT0380/D naplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem (1%). Další kanyly byly zavedeny do povrchové žíly levé dolní končetiny (*vena saphena*) a do pravé hrdelní žíly (*vena jugularis*). Po stabilizaci tlaku potkana, byl započat pokus aplikací 100 ng/kg NA Hamiltonovou pipetou přes kanylu zavedenou do hrdelní žíly a do 15 sekund od ukončení aplikace NA, byla kanyla propláchnuta 50 µl heparinizovaného fyziologického roztoku. Po 3 minutách nebo poté, co byl krevní tlak stabilizován, byl znovu aplikován NA, ale tentokrát ve vyšší dávce 500 ng/kg. Následně byla aplikace oběma koncentracemi NA opakována. Po pěti minutách, nebo po ustálení hodnot krevního tlaku, bylo aplikováno nejprve 0,1 ml fyziologického roztoku do kanyly v dolní končetině a kanyla byla opět propláchnuta 50 µl heparinizovaného fyziologického roztoku. Po stabilizaci tlaku byly aplikovány obě dávky NA. Dále se pokračovalo stejně, ale místo fyziologického roztoku byl aplikován roztok metabolitu a to ve vzrůstajících dávkách od 0,2 mg/kg do 25 mg/kg ve stejných objemech jako fyziologický roztok s výjimkou nejvyšší dávky (z důvodu nerozpustnosti byl použit objem 0,2 ml). Účinky každého z metabolitů byly testovány na 3 - 5 potkanech a 3 byli kontrolní.

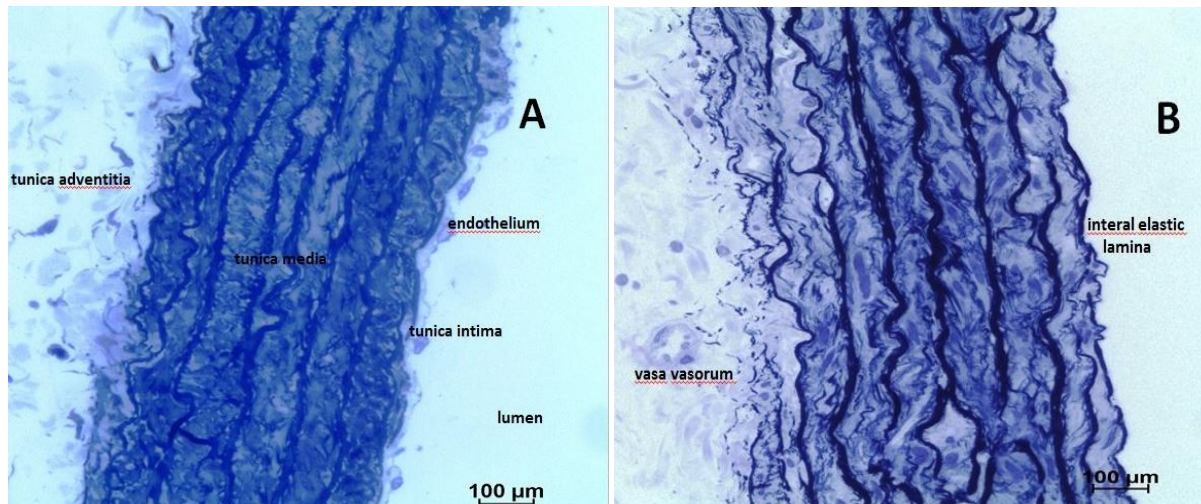
3.3.7 Bod 7 - Zjištění mechanismu účinku 3 účinných metabolitů v aortě

potkana

Mechanismus účinku kvercetinu a vybraných metabolitů byl zjišťován na cévě s endotelem i bez endotelu. U cév s endotelem byla sledována relaxace za přítomnosti blokátoru NO syntázy (L-NAME) a antagonisty muskarinových receptorů (atropin). Cévy byly připraveny stejným způsobem, jaký je popsán výše (bod 1 – kapitola 3.3.1). U cév bez endotelu byl před umístěním do aparatury odstraněn endotel za pomoci zubní nitě, která se provlékla lumen cév.

Účinnost odstranění endotelu za pomoci zubní nitě byla ověřena histologicky (Obr. 16). Aortální kroužky byly zafixovány ponořením do studeného 3% glutaraldehydu a následně v 1% OsO₄ (obojí ve fosfátovém pufru o pH 7,2 – 7,4), dehydratovány v acetonu a propylenoxidu a vloženy do pryskyřičné směsi Durcupan ACM a Epon 812. Preparáty byly nařezány na ultramikrotomu LKB na 1 μm úseky a obarveny toluidinovou modří. Preparáty byly prohlédnuty pod mikroskopem OLYMPUS PROVIS AX-70 s digitální kamerou Prog Res CT 3 (Jenoptik, Vitana Corporation, Kanada) a procesorem na analýzu snímků NIS – ELEMENTS AR 4.00.11.

V případě použití L-NAME nebo atropinu byly cévy před přidáním druhé koncentrace NA inkubovány v Krebsově roztoku s L-NAME (100 μM) a s atropinem (50 μM) po dobu 30 minut. Následný postup byl totožný s výše zmíněným.



Obr. 16. Histologické preparáty: Aorta s intaktním endotelem (A) a aorta s mechanicky odstraněným endotelem (B). Obrázek byl převzat z publikace Najmanová *et al.*, 2016.

3.3.8 Bod 8 - Ověření účinku kvercetinu a jeho metabolitu kvercetinu-3-O-glukuronidu na potkanech

Podání kvercetinu i.v. potkanům

Kvercetin vázaný na polymer byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku a podán čtyřem SHR potkanům v jednotlivých dávkách (0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2,5 mg/kg a 5 mg/kg). Samotný polymer byl ve stejných dávkách podán dvěma SHR. Aplikován byl stejně jako v předchozích experimentech po nutné chirurgické přípravě v celkové anestezii (pentobarbital) do povrchové žíly levé dolní končetiny a i v tomto případě byla sledována okamžitá změna tlaku a srdeční frekvence.

Podání kvercetin-3-O-glukuronidu potkanům i.v. – okamžitý a dlouhodobý

vliv na tlak krve

Kvercetin-3-O-glukuronid byl podán třem SHR potkanům v jednotlivých dávkách, kdy se stejně jak v předešlých experimentech sledoval okamžitý vliv na tlak krve a srdeční frekvenci. Látka rozpuštěná ve fyziologickém roztoku byla podána kanylou do povrchové žíly levé dolní končetiny a to v dávkách 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2,5 mg/kg a 5 mg/kg. Dávky od 0,01 až po 2,5 mg/kg byly podány třem potkanům. Poslední dávka byla testována pouze na jednom z nich. Roztoky v těchto dávkách byly připraveny před započítím experimentu.

Následně byly znovu čerstvě připraveny poslední dvě dávky, které byly ihned po naředění aplikovány potkanům (dávka 2,5 mg/kg byla aplikována pouze jednomu zvířeti, dávka 5 mg/kg dvěma).

Dále byl sledován dlouhodobý vliv na tlak krve i srdeční frekvenci po aplikaci dávky 5 mg/kg. Kvercetin-3-O-glukuronid byl aplikován 3 potkanům, dalším třem byl aplikován fyziologický roztok a sloužili jako kontrolní skupina. Experiment probíhal pod dobu 4 hodin v celkové anestezii navozené a udržované podáním pentobarbitalu.

Neinvazivní měření krevního tlaku po i.v. aplikaci kvercetinu vázaného na polymer

Neinvazivní měření tlaku krve se provádělo na dvanácti SHR, kteří byly znehybněni v plastové kleci. Před započítím těchto experimentů, bylo nutné trénovat potkany na pobyt v plastových klecích a na přítomnost okluzní manžety. Tento výcvik trval dva týdny.

V den experimentu byl potkan umístěn do plastové klece. V průběhu jejich aklimatizace, která trvala 5 – 10 minut, byl ponořen jejich ocas do teplé vody, která způsobila

dilataci cév, a očištěn. Do dilatované ocasní žíly bylo aplikováno 5 mg/kg kvercetinu navázaného na polymer, nebo polymer samotný. Jak směs kvercetinu s polymerem, nebo polymer samotný, byly před podáním rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. Látky byly aplikovány v objemu 0,3 ml.

Ihned po aplikaci, byla celá přední část plastové klece zakryta, aby byl snížen vliv vnějších stimulů a na proximální část ocasu potkana byla nasazena okluzní manžeta s pulzním převodníkem IN125 INBP Controller (ADInstruments Pty Ltd., Bella Vista, NSW 2153, Austrálie) Tento přístroj pro měření tlaku krve a pulzu byl spojen přes PowerLab high-performance data acquisition hardware (PowerLab 8/30, ADInstruments Pty Ltd., Bella Vista, NSW 2153, Austrálie) s počítačem s LabChart softwarem.

V průběhu prvních deseti minut od aplikace byl měřen krevní tlak a pulz každou minutu a pak každých 15 minut, 20 minut, 25 minut, 30 minut a 60 minut. Další měření proběhlo po 12 h, 24 h, 36 h, 48 h a 72 h. Potkani měli s výjimkou úvodních 30 minut plný přístup k vodě a potravě.

3.4 Statistická analýza

Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (standard deviation, SD) s výjimkou *in vitro* experimentů s izolovanými cévami, kde jsou zobrazeny podle běžného používání u tohoto typu experimentu jako průměr \pm standardní chyba průměru (standard error mean, SEM). Pro statistické porovnání byl použit program GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software, USA). V závislosti na typu experimentu byly použity následující testy: obousměrná ANOVA s post hoc analýzou podle Sidaka, a jednosměrná ANOVA s post hoc analýzou podle Dunneta a lineární regrese. V případě vasodilatačních křivek byly pro porovnání použity 95% konfidenční intervaly a koncentrace vyvolávající 50% účinek (EC₅₀).

4. Výsledky

4.1 Bod 1 - *In vitro* screening vasoaktivních vlastností kvercetinů a jeho známých metabolitů na potkaní aortě

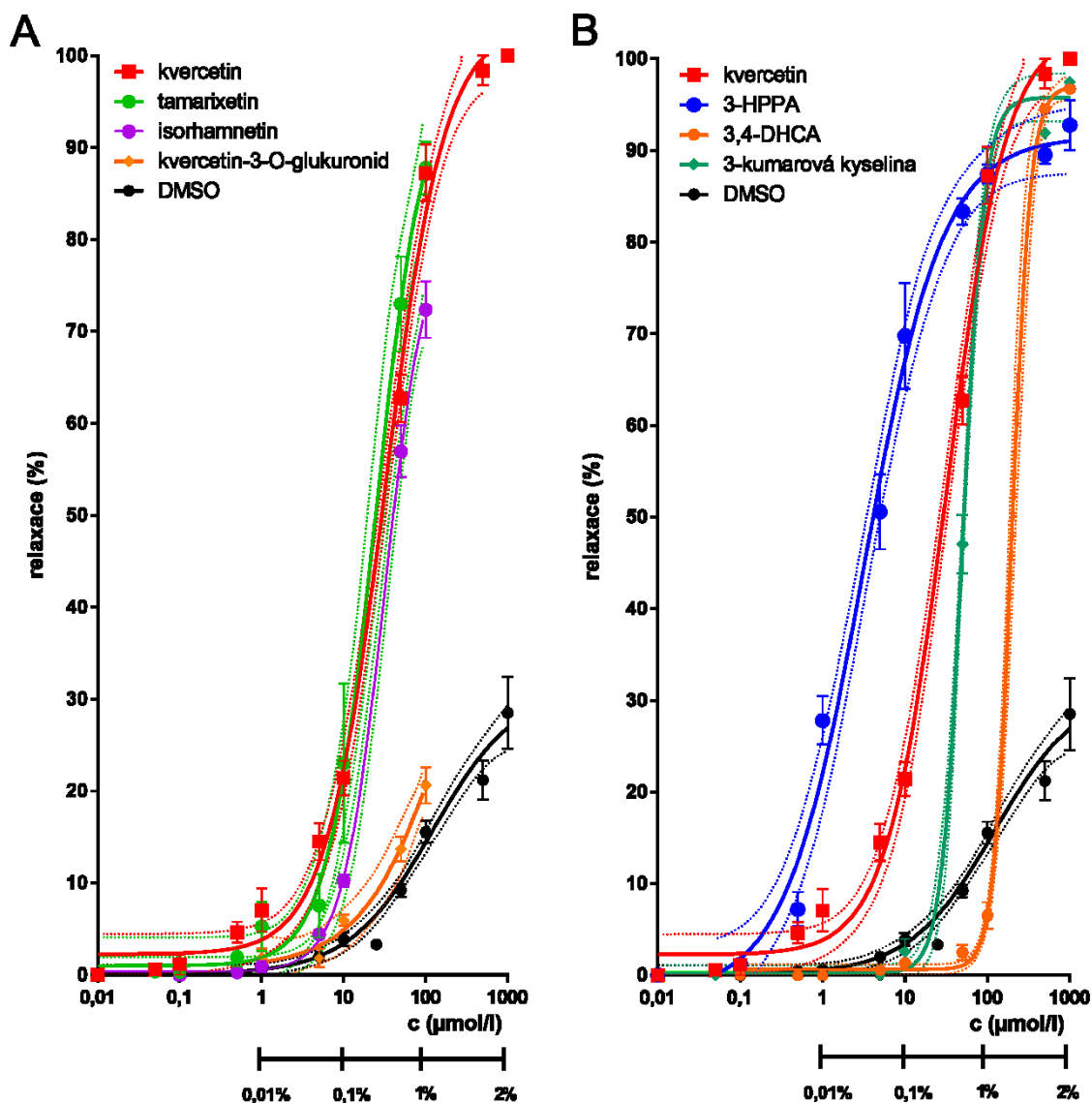
Noradrenalin způsobil dlouhodobou a stabilní kontrakci u cév s neporušeným endotelem. Následné přidávání kumulativních dávek kvercetinů a jeho metabolitů v dávkách, které vedly k dosažení koncentrací testovaných látek od 10 nM až do 100 μM, případně 1 mM, mělo za následek dávkově závislou vasodilataci v různém rozsahu. Kvercetin, jeho methylderiváty isorhamnetin a tamarixetin, 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (3-HPPA), 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (3,4-DHPA), 3-kumarová kyselina, 3,4-dihydroxyhydrokskořicová kyselina (3,4-DHCA) a 4-methylkatechol navodily maximální, tj. 90-100% relaxaci cévy (Obr. 17 a 18).

Nejúčinnější strukturou byla 3-HPPA, která způsobila částečnou relaxaci už při dávce 100 nM, zatímco kvercetin začal relaxovat cévu při dávce 5 krát větší. Methylderiváty isorhamnetin a tamarixetin společně s 4-methylkatecholem vykazovaly podobné vasorelaxační účinky jako kvercetin. Na druhou stranu 3-kumarová kyselina a 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionová kyselina relaxovaly cévu až při vyšších koncentracích. 3-hydroxyfenyloctová kyselina, 3-hydroxybenzoová kyselina a floroglucinol relaxovali cévu v menším rozsahu a při vyšších koncentracích, zatímco ostatní testované látky homovanilinová kyselina, kvercetin-3-O-glukuronid, 3-fenylpropionová kyselina, 2-hydroxyfenyloctová kyselina, 4-hydroxyfenyloctová kyselina a 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina měli vasorelaxační potenciál podobný rozpouštědлу (Obr. 17A a 19).

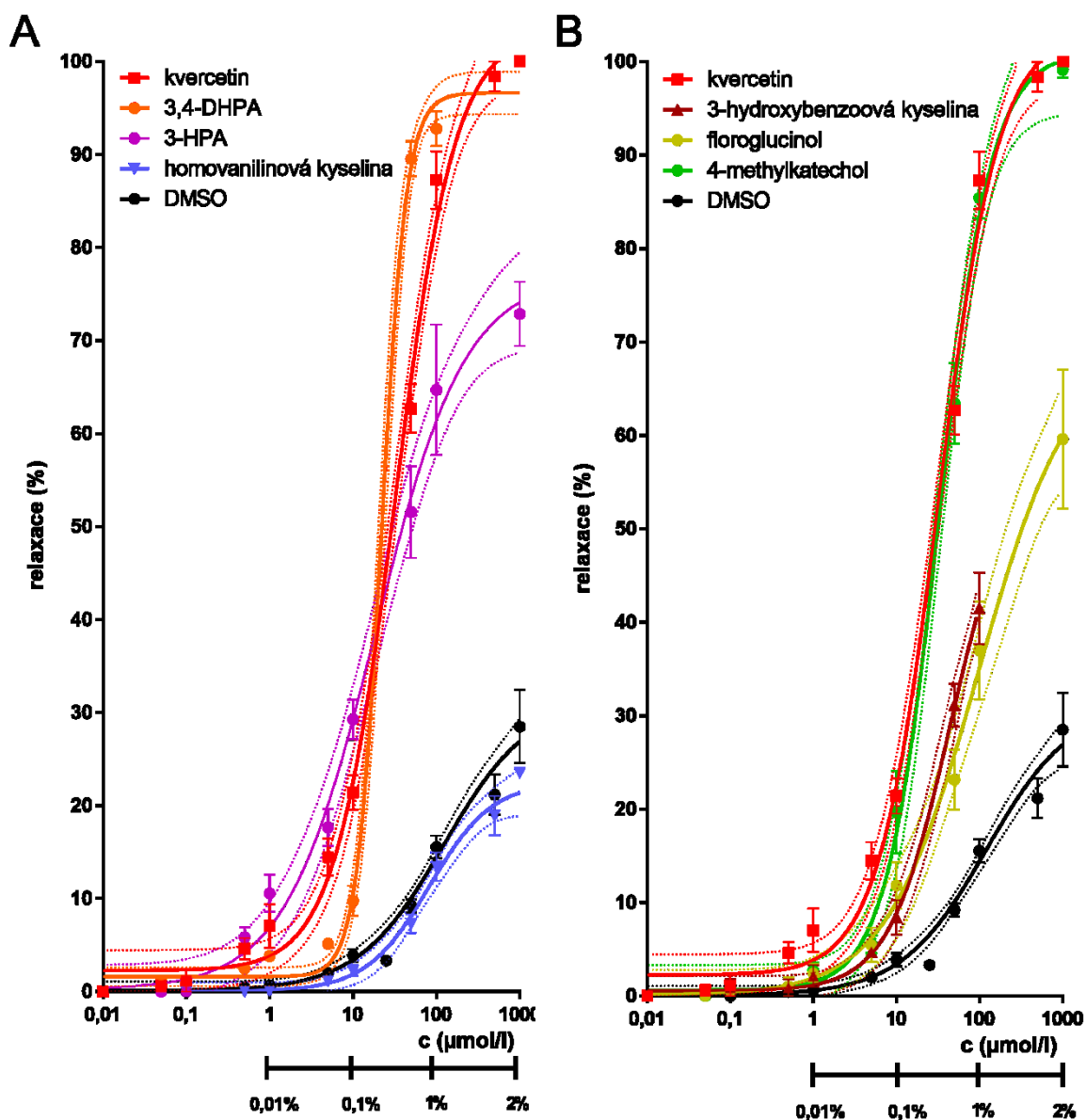
Porovnáním 95% konfidenčních intervalů vaskulární reaktivity získáme tuto posloupnost: 3-HPPA > tamarixetin = isorhamnetin = kvercetin = 3,4-DHPA = 4-

metylkatechol = 3-hydroxyfenyloctová kyselina > 3-hydroxybenzoová = floroglucinol > 3,4-DHCA > rozpouštědlo.

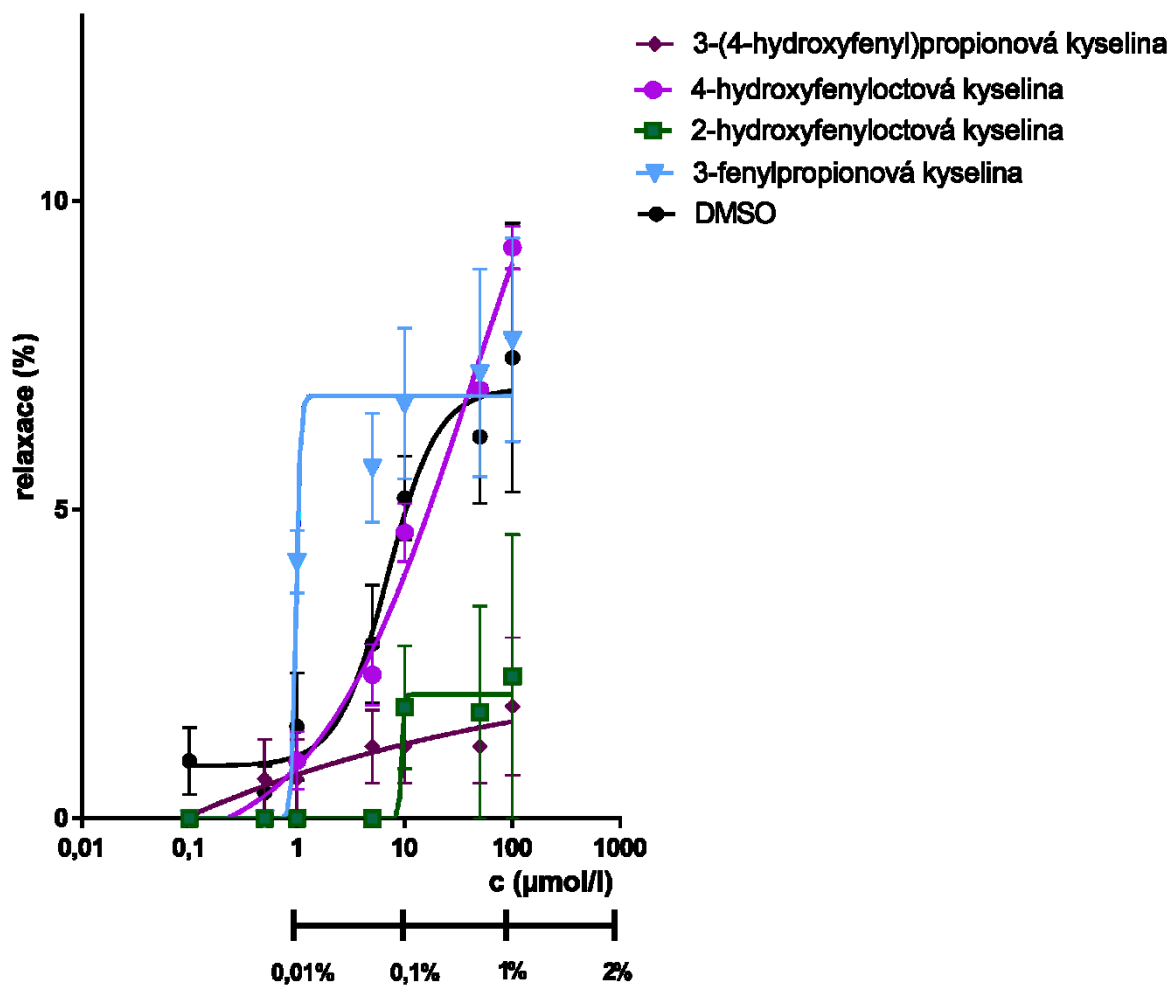
Při porovnání účinné koncentrace vedoucí k 50% relaxaci cév (EC_{50}) byla posloupnost podobná, ale ne identická (Obr. 20).



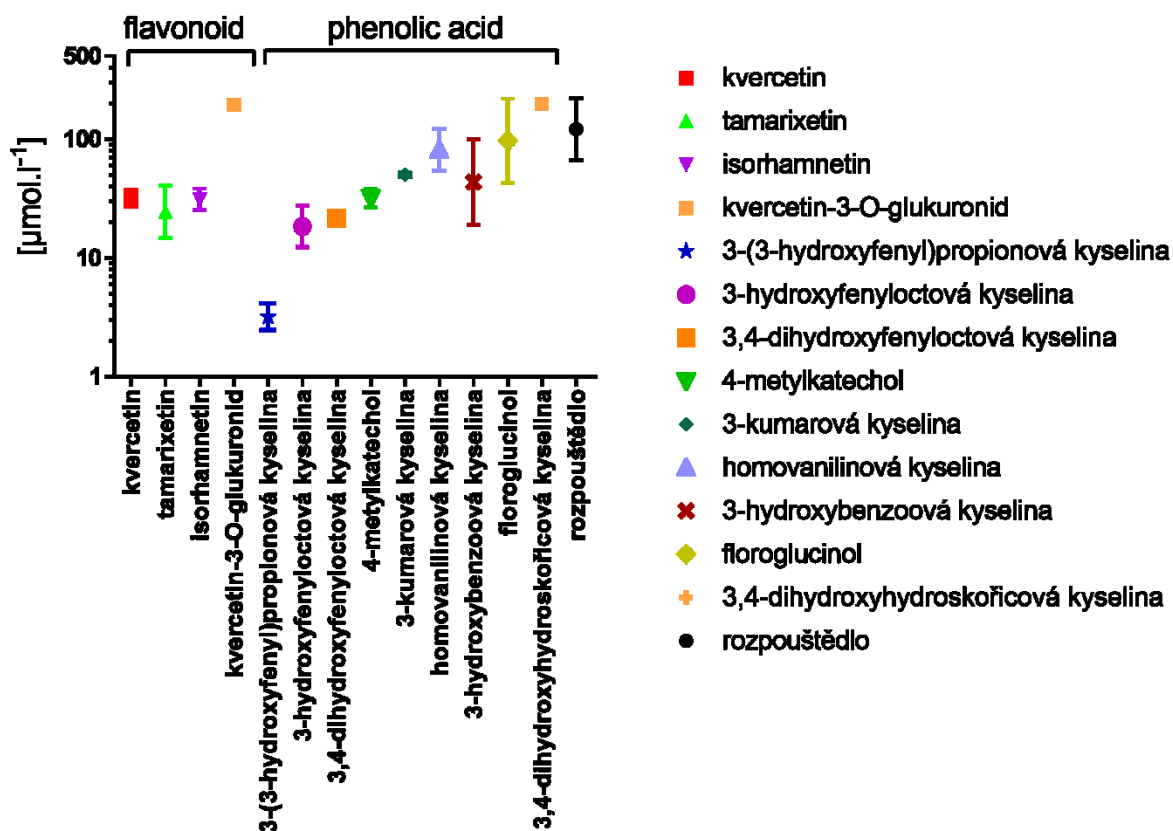
Obr. 17. Porovnání vasorelaxačních účinků vzrůstajících dávek kvercetinu a jeho metabolitů na potkaní aortě kontrahované noradrenalinem ($10 \mu\text{M}$). **A:** methylderiváty kvercetinu a kvercetin-3-O-glukuronid a **B:** deriváty kyseliny propionové. 3-HPPA = 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina, 3,4-DHCA = 3,4-dihydroxyhydroskořicová kyselina. Každá křivka je tvořena průměrem z nejméně tří měření na aortálních kroužcích. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Koncentrace DMSO je zobrazena v procentech pod osou x.



Obr. 18. Porovnání vasorelaxačních účinků vzrůstajících dávek kvercetinu a jeho metabolitů na potkaní aortě kontrahované noradrenalinem (10 μM). **A:** deriváty kyseliny octové a **B:** deriváty kyseliny benzoové a fenolu. 3,4-DHPA = 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina, 3-HPA = 3-hydroxyfenyloctová kyselina. Každá křivka je tvořena průměrem z nejméně tří měření na aortálních kroužcích. Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Koncentrace DMSO je zobrazena v procentech pod osou x.



Obr. 19. Vasorelaxační účinky ostatních metabolitů kvercetinu na potkaní aortě kontrahované NA (10 µM). Každá křivka je tvořena průměrem z měření na třech aortálních kroužcích. Data jsou prezentována jako průměr ± SEM. Koncentrace DMSO je zobrazena v procentech pod osou x.

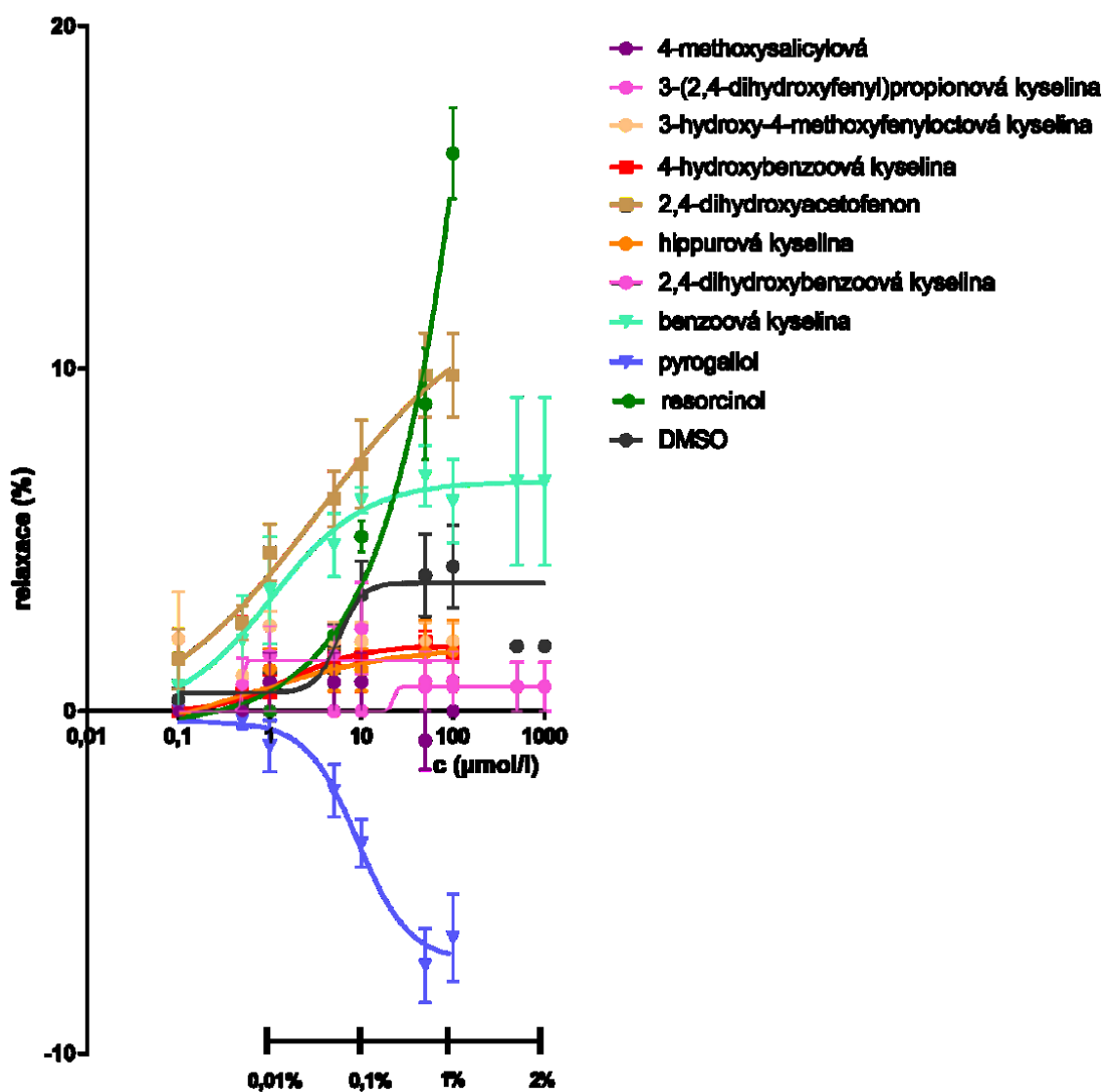


Obr. 20. Porovnání EC₅₀ vasodilatačních účinků kvercetinu a jeho metabolitů na potkaní aortě. Hodnoty EC₅₀ jsou zobrazeny s 95% konfidenčním intervalem. Látky, které nebyly účinné (3-fenylpropionová kyselina, 2-hydroxyfenylpropionová kyselina, 4-hydroxyfenyloctová kyselina a 3-(4-hydroxyfenyl)propionová kyselina) nejsou v grafu zobrazeny.

4.2 Bod 2 - *In vitro* screening vasoaktivních vlastností dalších metabolitů

flavonoidů na potkaní aortě

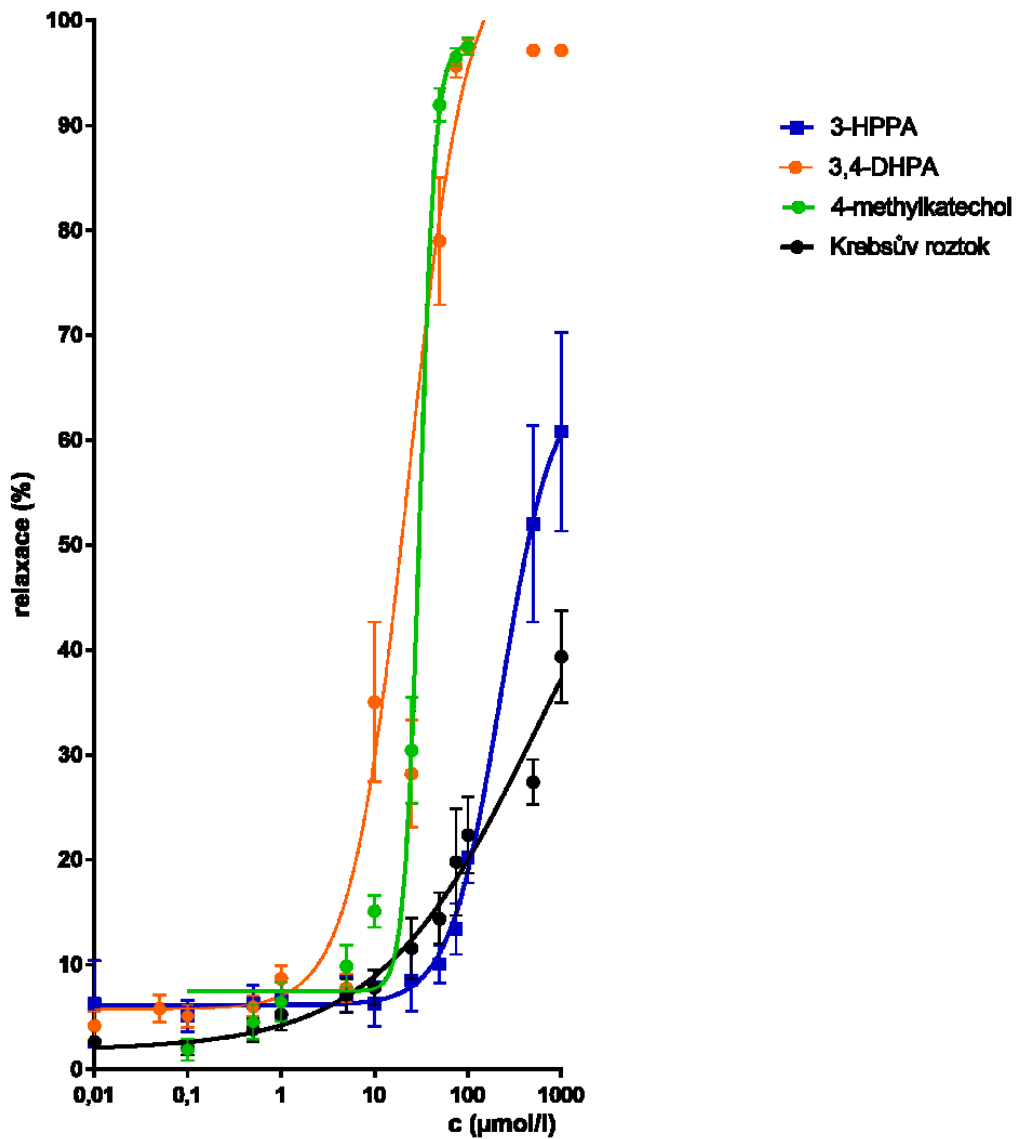
Při testování ostatních známých metabolitů flavonoidů tvořených mikroflórou nebyla nalezena žádná látka, která by byla stejně nebo více účinná než kvercetin. Většina testovaných látek měla velmi malý vliv na vyvolání relaxace. Jimi vyvolaná vasodilatace nepřekročila 20% a to ani při nejvyšších dávkách (100 μ M a 1 mM). Posledně jmenované koncentrace nejsou ani dosažitelné v reálných biologických podmínkách. Za povšimnutí stojí ještě pyrogalol, který na místo relaxace cévu mírně kontrahoval. Shrnutí je v Obr. 21.



Obr. 21. Vasorelaxační účinky ostatních známých metabolitů flavonoidů na potkaní aortě kontrahované NA (10 μM). Každá křivka je tvořena průměrem ze tří měření na aortálních kroužcích. Data jsou prezentována jako průměr ± SEM. Koncentrace DMSO je zobrazena v procentech pod osou x.

4.3 Bod 3 - Porovnání účinků tří účinných metabolitů kvercetinů *in vitro* na potkaní *arteria mesenterica*

3-HPPA, která byla neúčinnější na aortě, vykazovala mnohem menší schopnost relaxovat mesenterické arterie. Vasodilatace začala až při dávce 25 μM a navozená relaxace dosáhla v průměru 60%. Oproti tomu 3,4-DHPA začala kontrahovat signifikantně už při 10 μM a stejně jako na aortě dosáhla maximální relaxace. Účinek 4-methylkatecholu byl podobný ale nižší při koncentraci 10 μM . Relaxační křivky jsou shrnuty v Obr. 22.

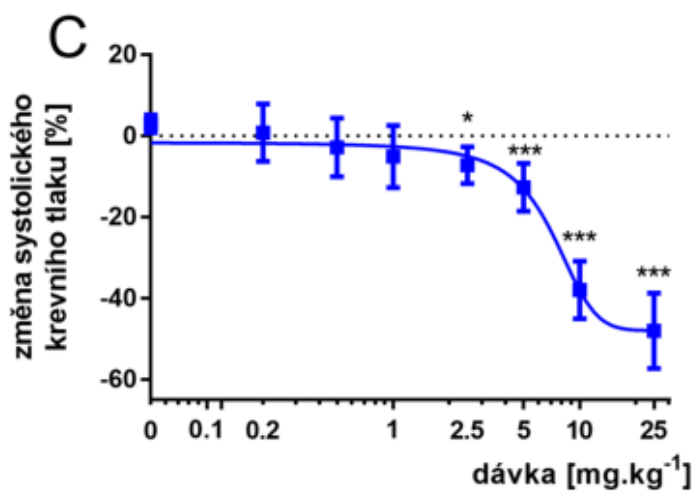
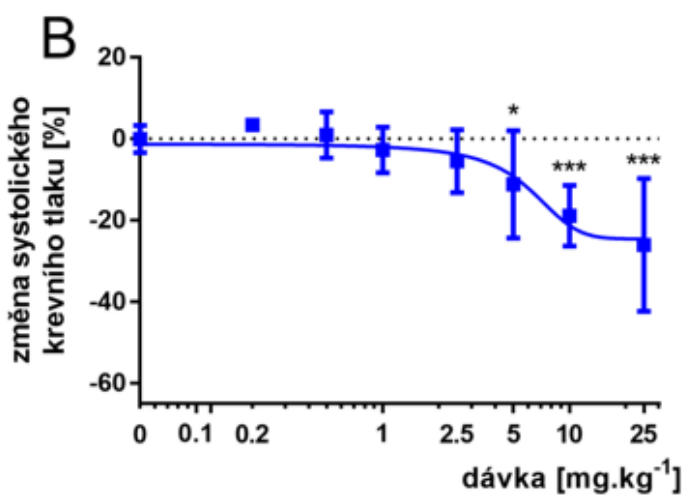
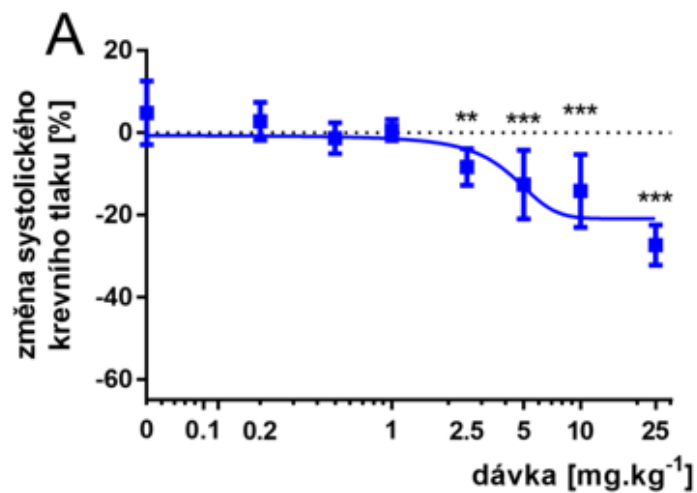


Obr. 22. Porovnání vasorelaxačních účinků tří účinných metabolitů na kroužcích mesenterické arterie. Každá křivka je tvořena průměrem z 6 až 15 měření. Data jsou prezentována jako průměr ± SEM.

4.4 Bod 4 - *In vivo* účinky různých dávek účinných metabolitů kvercetinu na krevní tlak

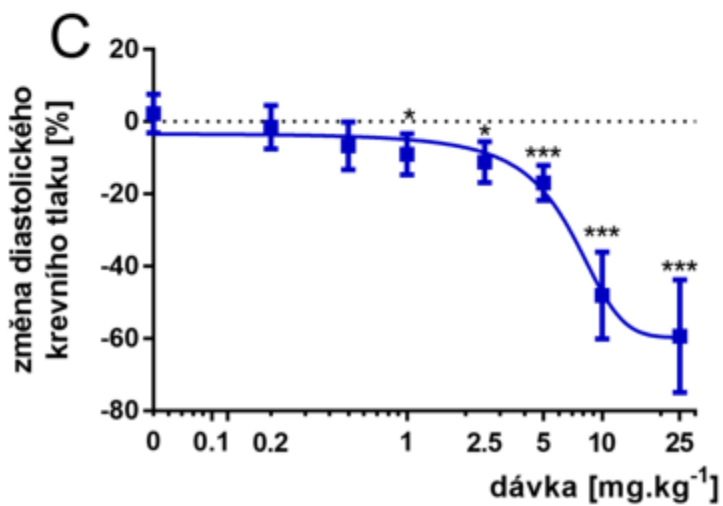
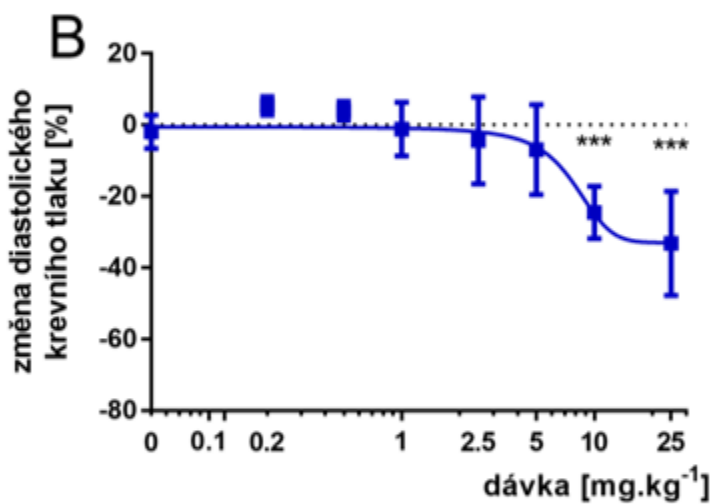
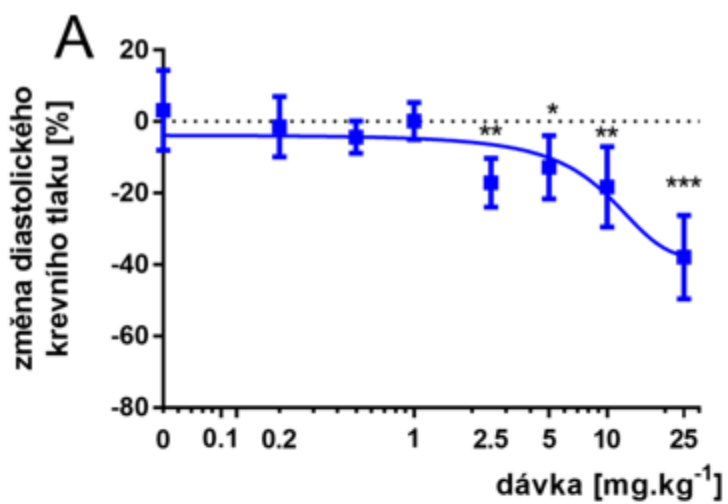
Po aplikaci zvyšujících se dávek 3-HPPA, 3,4-DHPA a 4-methylkatecholu došlo k postupnému snížení jak systolického, tak diastolického krevního tlaku (Obr. 23). Systolický tlak klesl signifikantně už po dávce 2,5 mg/kg u 3-HPPA a 4-methylkatecholu a 5 mg/kg u 3,4-DHPA (Obr. 23). Diastolický tlak u 4-methylkatecholu dokonce po dávce 1 mg/kg (Obr. 24C). U 3-HPPA to bylo po dávce 2,5 mg/kg zatímco u 3,4-DHPA až při podání 10 mg/kg (Obr. 24AB).

Při vzájemném porovnání antihypertenzního působení těchto tří metabolitů, došlo k největšímu poklesu systolického i diastolického tlaku krve při podání 4-methylkatecholu a to zejména při posledních dvou dávkách 10 a 25 mg/kg (Obr. 25). Ani jedna látka signifikantně neovlivnila srdeční frekvenci (Obr. 26).



Obr. 23. Vliv vzrůstajících dávek metabolitů kvercetinu na systolický krevní tlak Wistar:Han potkanů. A: 3-HPPA (n = 5), B: 3,4-DHPA (n = 4), C: 4-metylkatechol (n = 7),

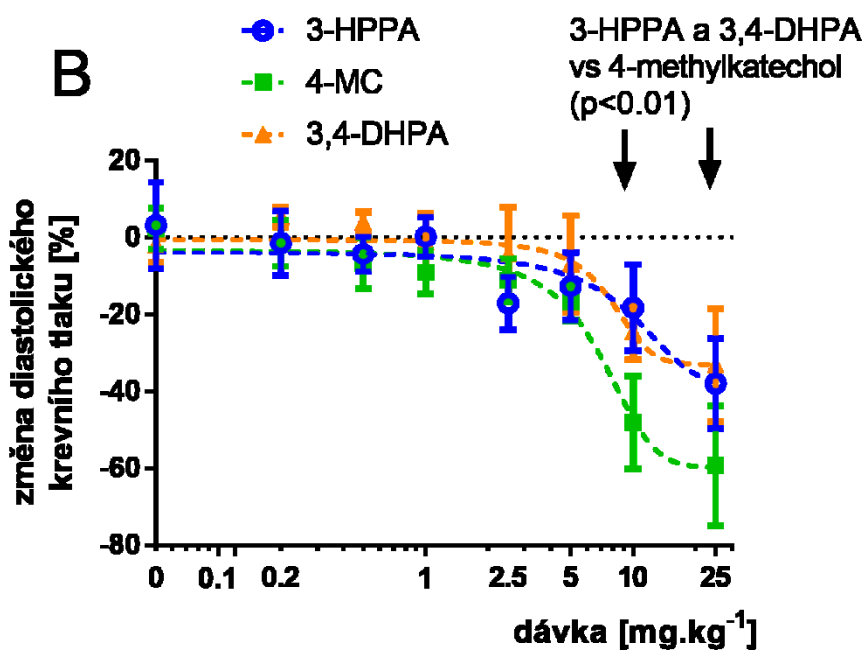
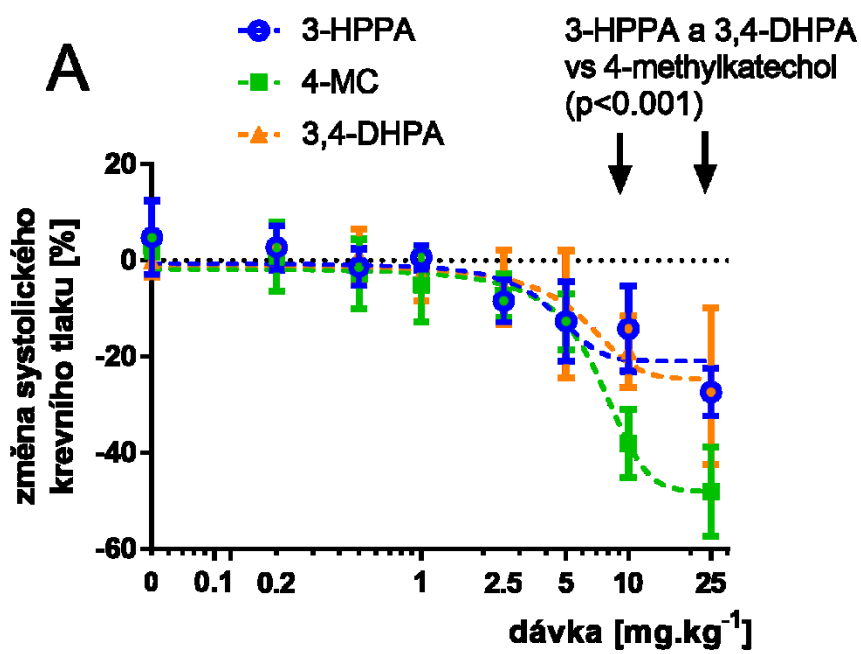
* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. čas 0.



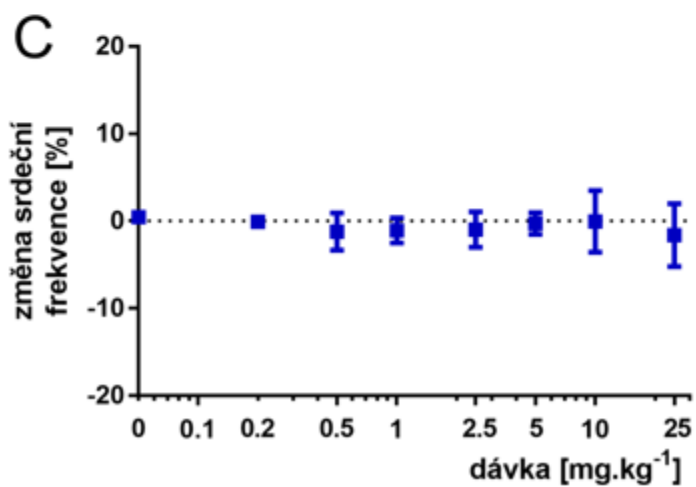
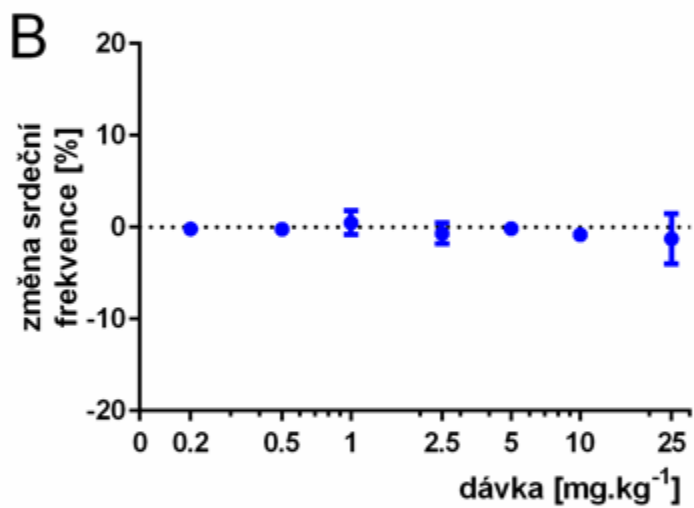
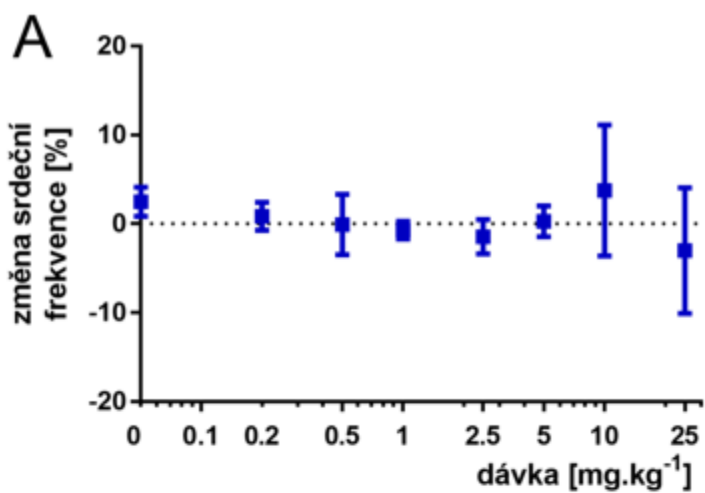
Obr. 24. Vliv vzrůstajících dávek metabolitů kvercetinu na diastolický krevní tlak

Wistar:Han potkanů. A: 3-HPPA (n = 5), B: 3,4-DHPA (n = 4), C: 4-metylkatechol (n = 7),

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. čas 0.



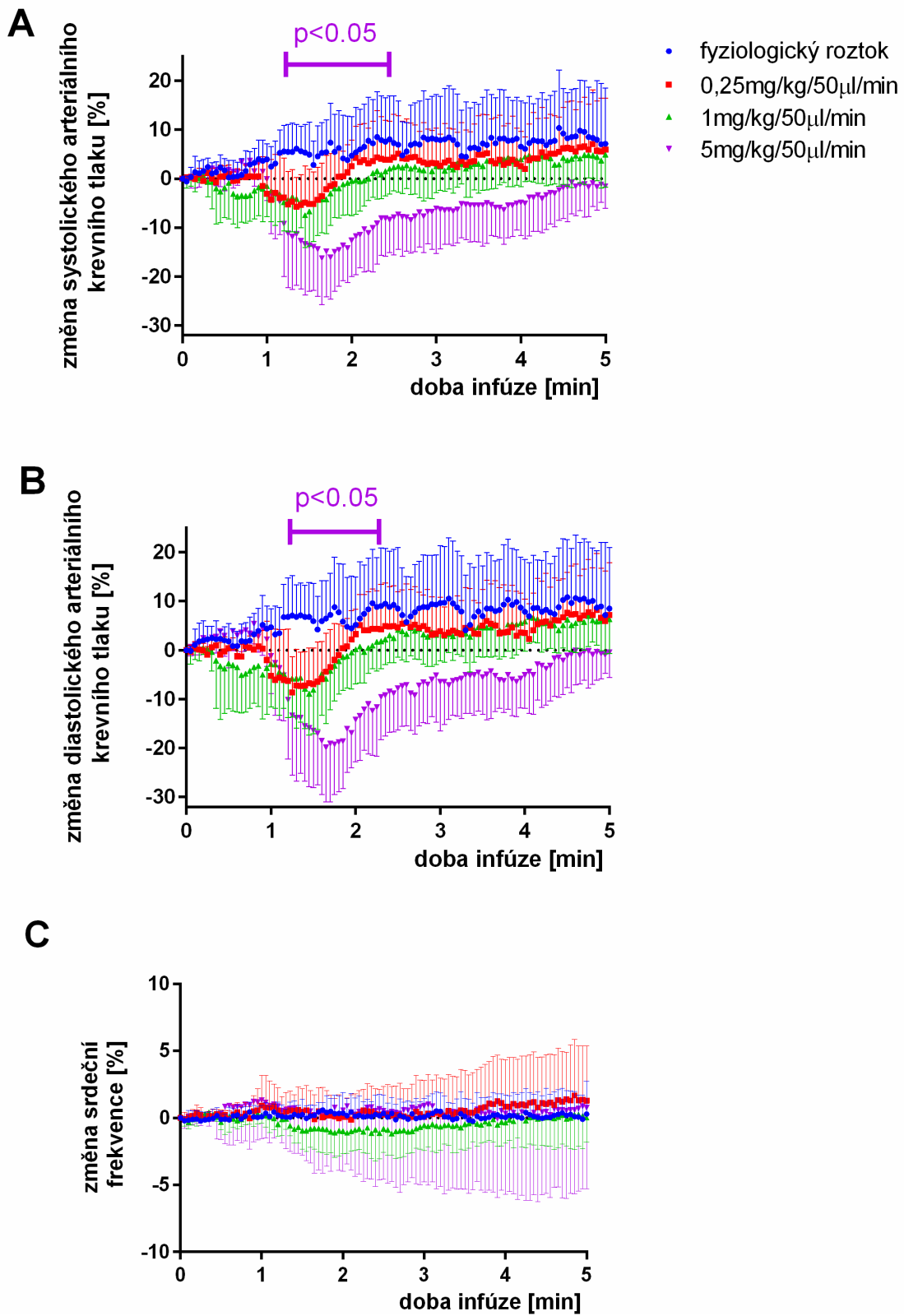
Obr. 25. Porovnání poklesu systolického (A) a diastolického (B) tlaku krve po aplikaci 3-HPPA, 3,4-DHPA a 4-methylkatecholu (4-MC).



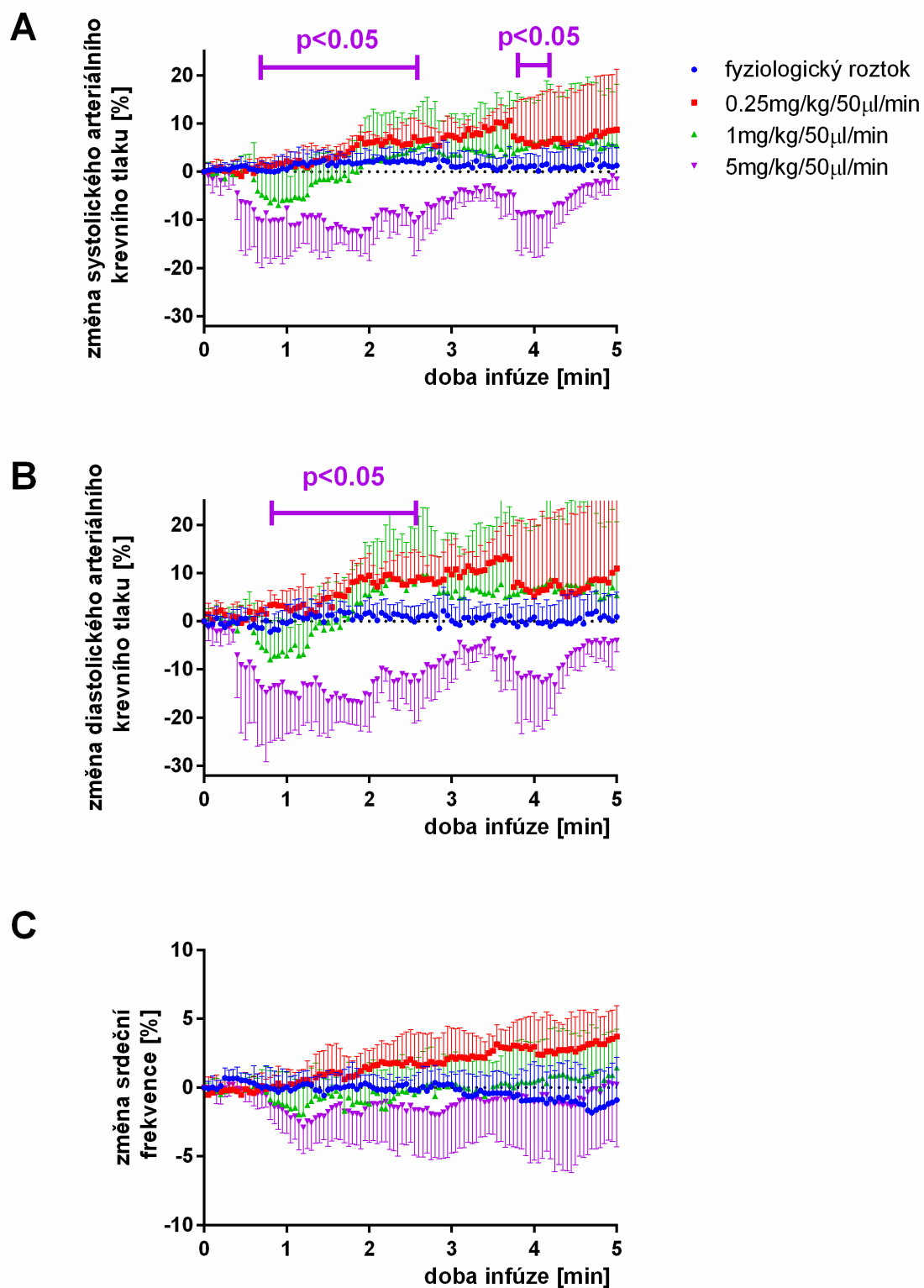
Obr. 26. Změna srdeční frekvence po aplikaci 3-HPPA (A), 3,4-DHPA (B) a 4-methylcatecholu (C).

4.5 Bod 5 - *In vivo* účinky infúze účinných metabolitů kvercetin na krevní tlak (imitace pomalé absorpce těchto látek z GITu)

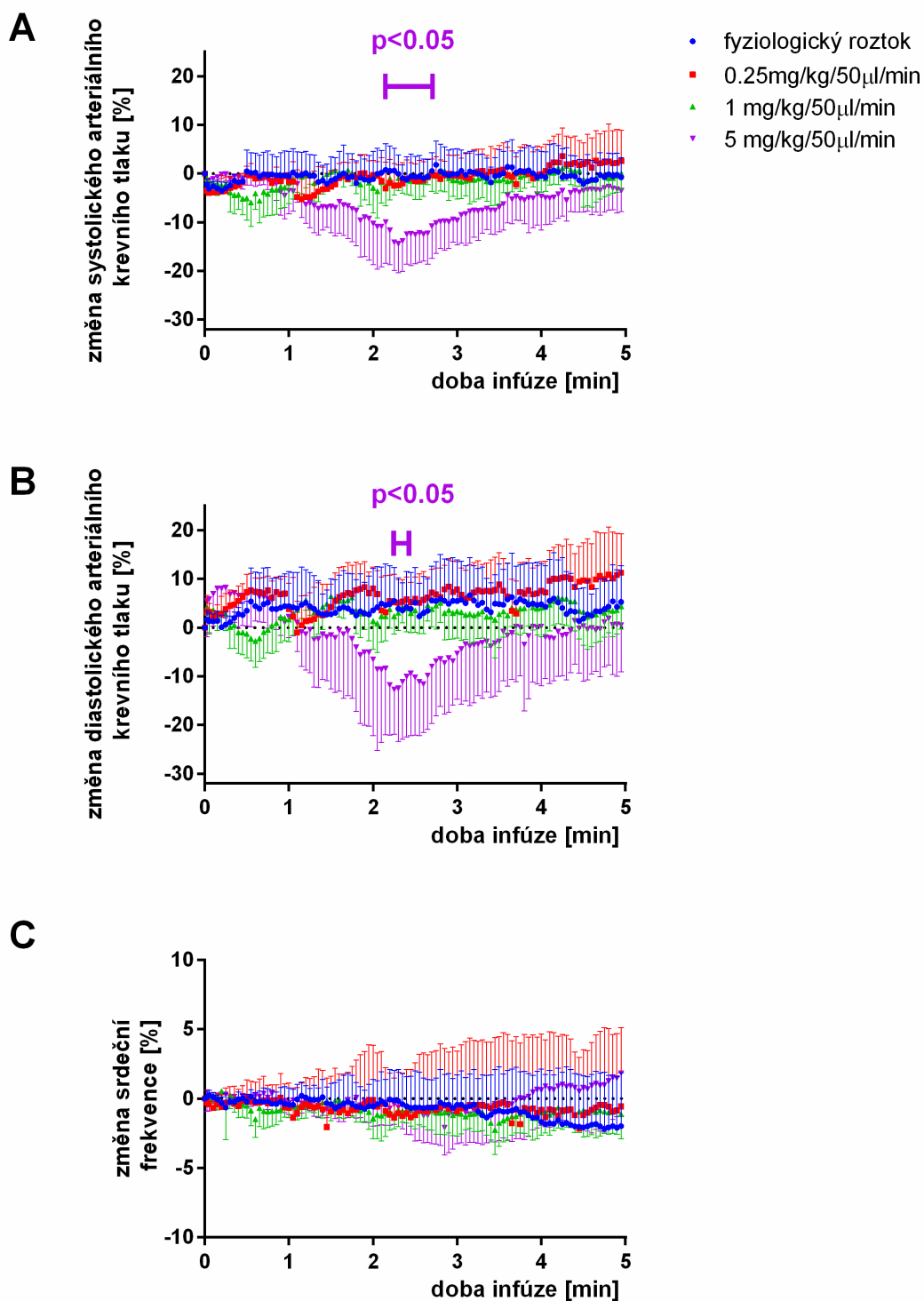
Pro simulování pomalého vstřebávání metabolitů z tlustého střeva byly aplikovány pětiminutové infúze. Nejprve bylo aplikováno 250 μ l fyziologického roztoku v průběhu 5 minut. Dále byly podány metabolity v dávkách 0,25 mg/kg rychlostí 50 μ l/min a v dávkách 1 mg/kg a 5 mg/kg stejnou rychlostí. Statistické významnosti ve snížení arteriálního krevního tlaku dosáhly ale všechny látky jen při nejvyšší rychlosti infúze (5 mg během 5 minut, rychlost 50 μ L roztoku za minutu). U 3-HPPA došlo ke snížení arteriálního krevního tlaku přibližně po první minutě s maximem poklesu v 90 vteřině, poté se krevní tlak postupně vyrovnal (Obr. 27). 3,4-DHPA vyvolala signifikantní pokles systolického i diastolického tlaku došlo již po 40 vteřinách od zahájení aplikace a tento pokles trval až 2 minuty, k dalšímu krátkodobějšímu poklesu systolického tlaku došlo po cca 4 minutách (Obr. 28). Pokles systolického i diastolického tlaku byl při podání 4-MC méně razantní (Obr. 29). Signifikantní pokles nastal až po dvou minutách a netrval déle než 40 vteřin u systolického tlaku krve, u diastolického nastal signifikantní pokles po cca 2 minutách a trval pouze 6 s. U žádné z těchto látek nedošlo k významné změně srdeční frekvence (Obr. 27-29C). Přes výše uvedené rozdíly nebyly mezi jednotlivými metabolity nalezeny rozdíly ve výši maximálního poklesu krevního tlaku (Obr. 30). Pokles krevního tlaku měl ale u všech látek dávkově závislý charakter (Obr. 31).



Obr. 27. Vliv infúze 3-HPPA na arteriální krevní tlak (A,B) a srdeční frekvenci (C) u 5 – 6 SHR.



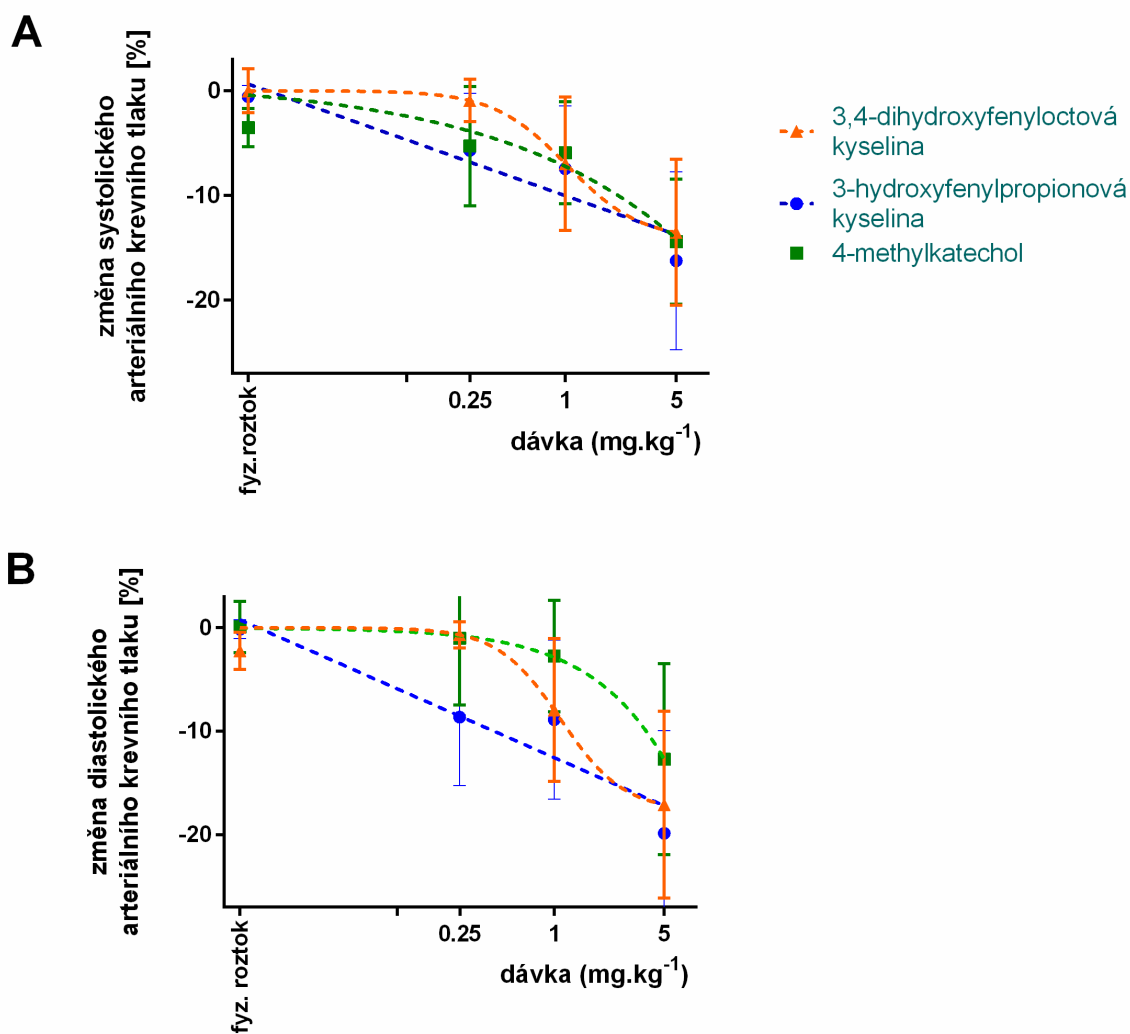
Obr. 28. Vliv infúze 3,4-DHPA na arteriální krevní tlak (A,B) a srdeční frekvenci (C) u 4 - 6 SHR.



Obr. 29. Vliv infúze 4-methylcatecholem na arteriální krevní tlak (A,B) a srdeční frekvenci (C) u 5 SHR.



Obr. 30. Porovnání poklesu krevního tlaku mezi testovanými látkami při nejvyšší rychlosti infúze (5 mg/kg). Rozdíly nebyly signifikantní.

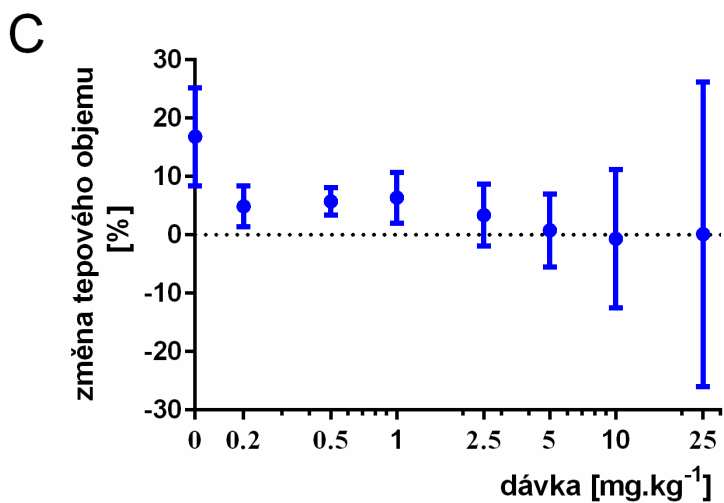
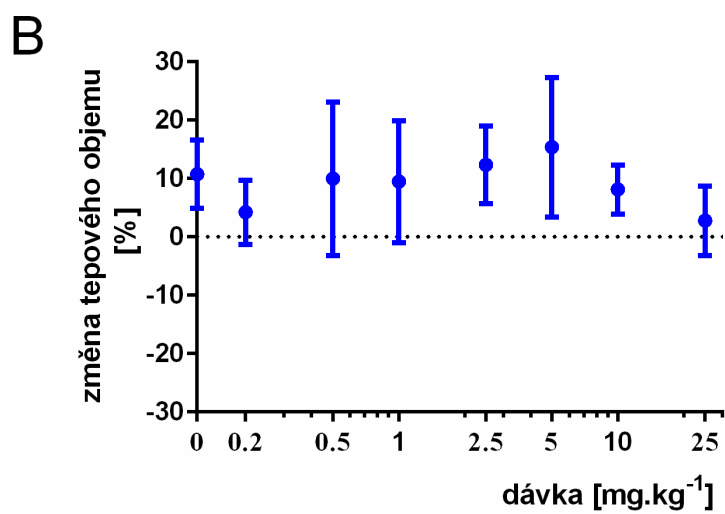
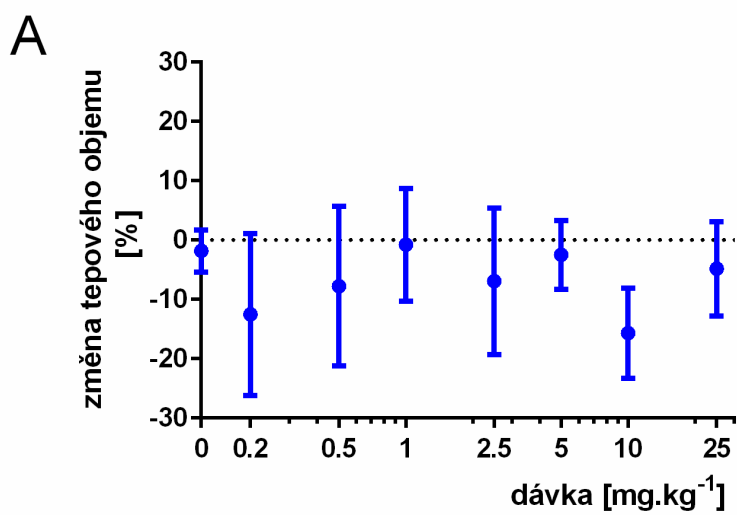


Obr. 31. Dávkově závislý pokles krevního tlaku ve vztahu k podané dávce v infúzi.

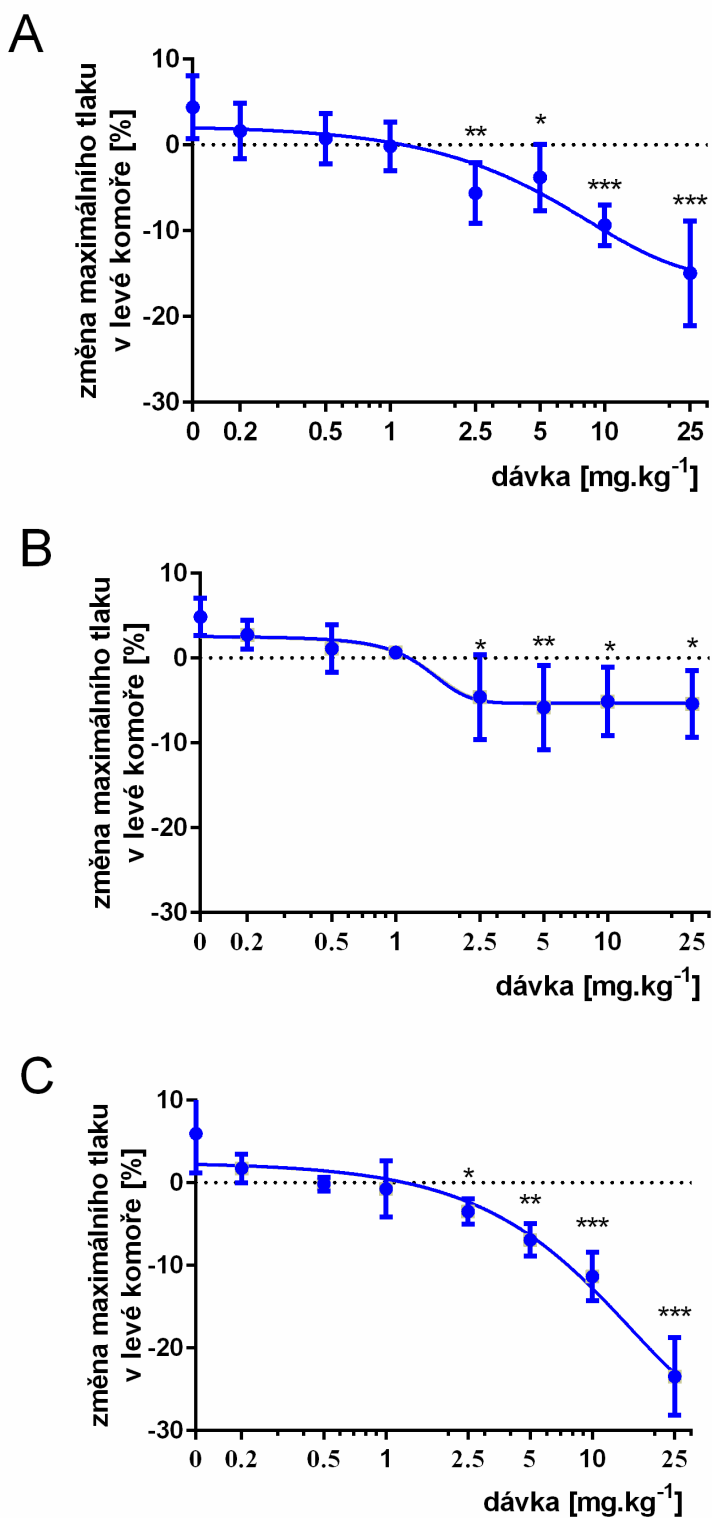
4.6 Bod 6 - *In vivo* analýza krevní tlak snižujícího vlivu účinných metabolitů

4.6.1 *Sledování vlivu na srdeční kontraktilitu a relaxaci*

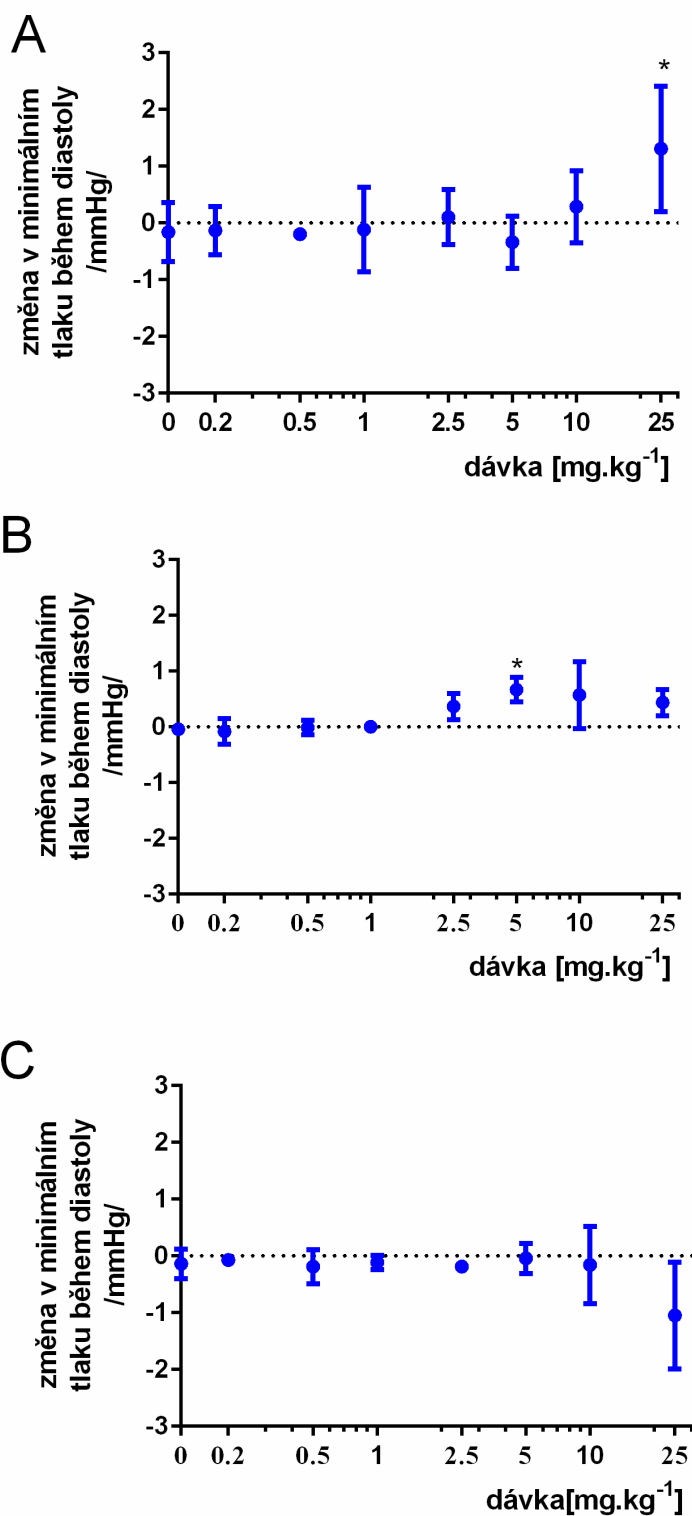
Vzhledem k tomu, že pokles krevního tlaku pozorovaný na celotělové úrovni u potkanů může být způsoben také poklesem srdeční činnosti, byl do levé komory zaveden katetr k měření změn tlaku a objemu krve. Tímto způsobem jsme získali data o tepovém objemu a změnách maximálního a minimálního tlaku v levé komoře. Ani u jedné látky nepoklesl významně tepový objem (Obr. 32). Naopak u všech látek byl pozorován dávkově závislý pokles maximálního tlaku v levé komoře (Obr. 33). U minimálního tlaku v diastole v levé komoře byly zaznamenány minimální změny, i když výjimečně některé z nich dosáhly statistické významnosti (Obr. 34).



Obr. 32. Vliv různých dávek testovaných metabolitů na tepový objem. A: 3-HPPA (n = 5), B: 3,4-DHPA (n = 3) a C: 4-methylcatechol (n = 3)

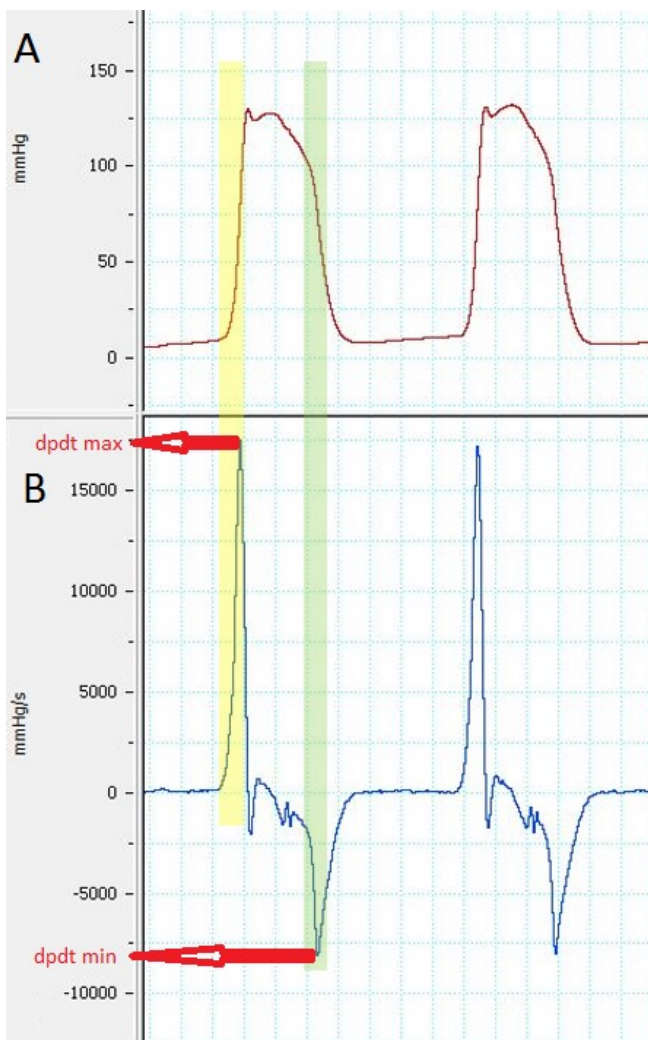


Obr. 33. Vliv různých dávek testovaných metabolitů na maximální tlak (během systoly) v levé komoře. **A:** 3-HPPA (n = 5), **B:** 3,4-DHPA (n = 3) a **C:** 4-methylcatechol (n = 3). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 čas 0.



Obr. 34. Vliv různých dávek testovaných metabolitů na změnu minimálního tlaku během diastoly v levé komoře. A: 3-HPPA (n = 5), B: 3,4-DHPA (n = 3) a C: 4-methylcatechol (n = 3). * p<0.05 čas 0.

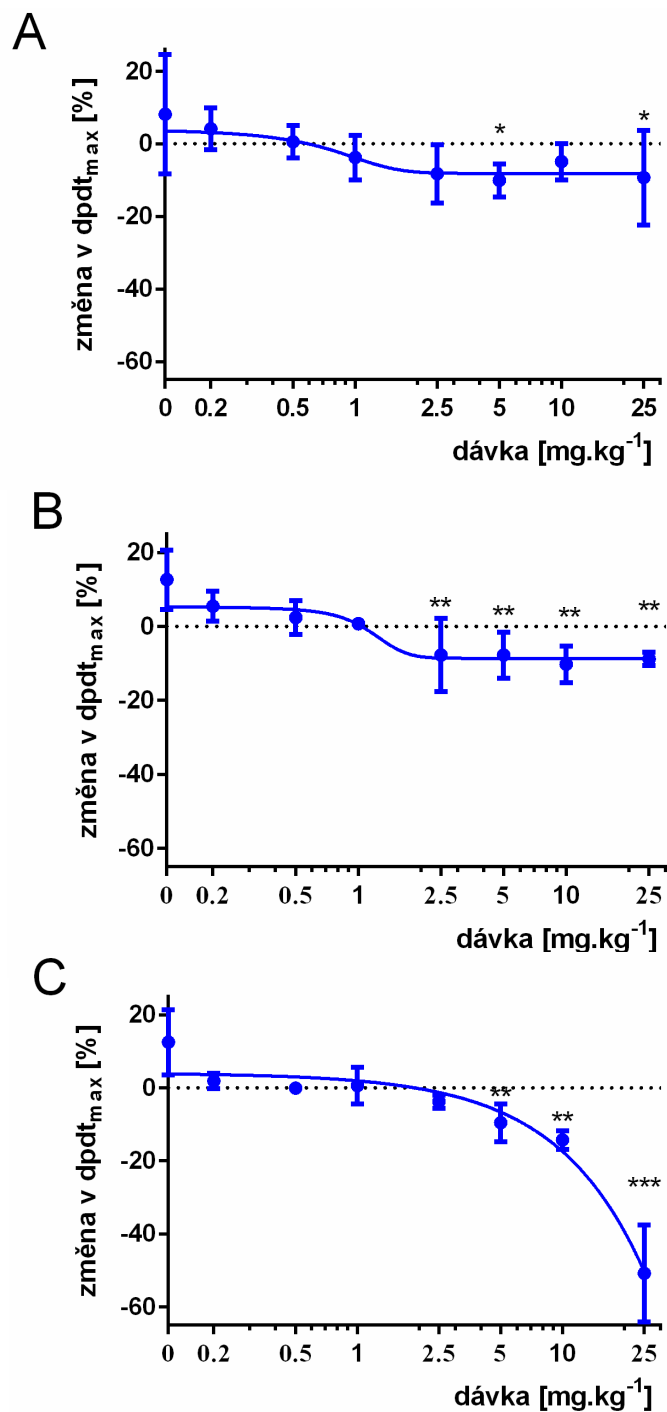
Vzhledem k poklesu nejvyššího dosaženého tlaku v levé komoře a malým změnám v minimálním tlaku byly nejdříve další matematickou analýzou vyhodnoceny základní parametry srdeční kontraktility (maximální rychlost vzestupu tlaku v levé komoře, $dpdt_{max}$) a relaxace (maximální rychlost poklesu tlaku v levé komoře, $dpdt_{min}$). Detailnější vysvětlení těchto pojmů v Obr. 35.



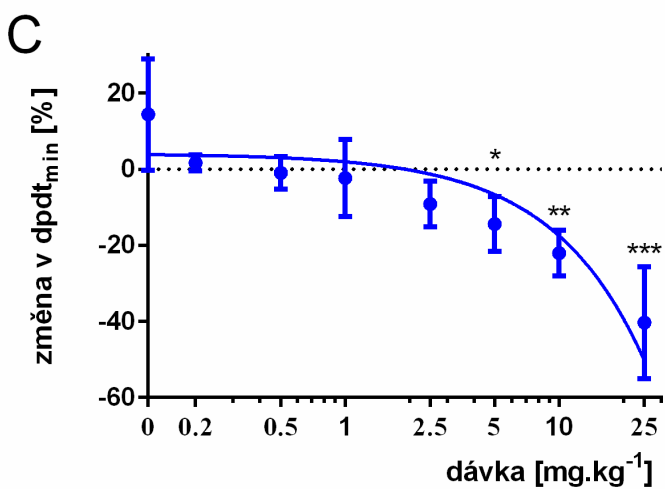
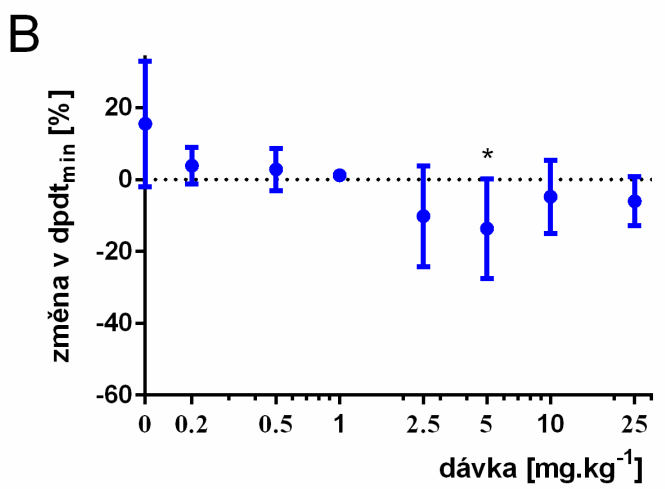
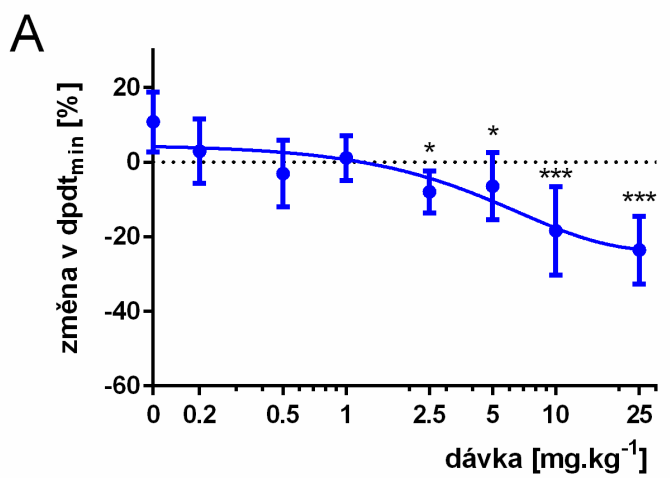
Obr. 35. Křivka tlaku v levé komoře a první derivace ve vztahu k času. A: záznam tlaku v levé komoře, **B:** první derivace tlaku v levé komoře ve vztahu v času. Žlutě je zobrazena oblast isovolumické kontrakce, ve které rychle stoupá tlak v komoře a nachází se tam také maximální rychlost vzestupu tlaku ($dpdt_{max}$). Zelená oblast znázorňuje isovolumickou relaxaci. V této fázi klesá fyziologicky rychle tlak uvnitř komory a lze zde určit tedy maximální rychlost poklesu krevního tlaku ($dpdt_{min}$).

Všechny látky vedly k určitému poklesu v $dpdt_{max}$, zejména ve vyšších dávkách (Obr.

36) a zejména 3-HPPA a 4-methylkatechol i $dpdt_{min}$ (Obr. 37).



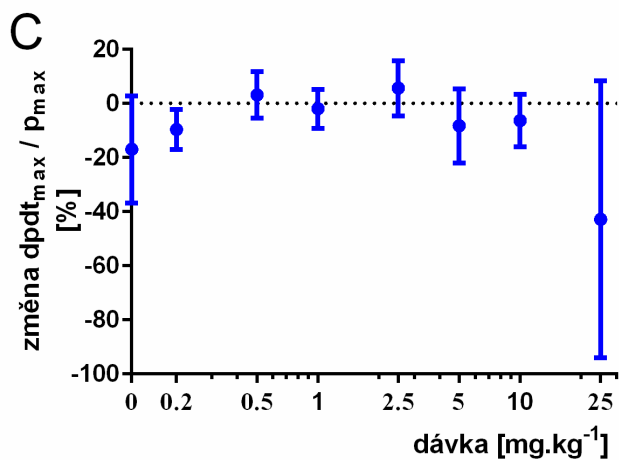
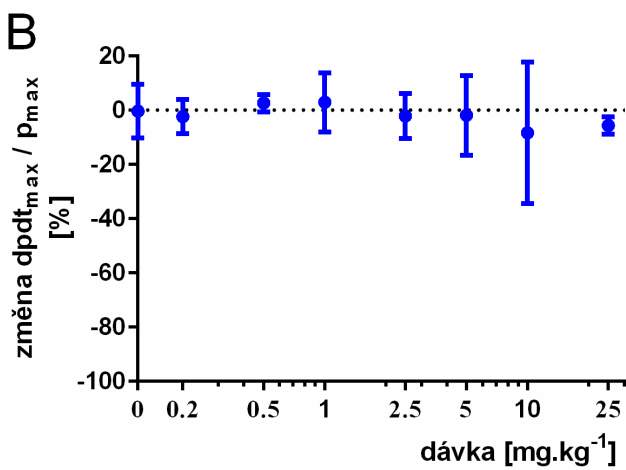
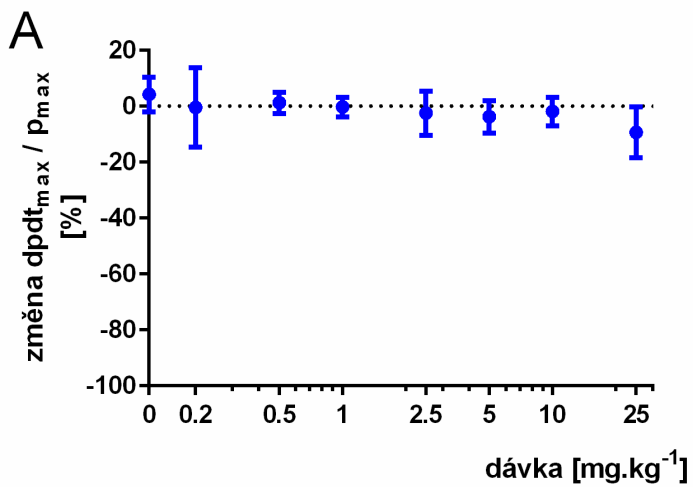
Obr. 36. Vliv různých dávek testovaných metabolitů na $dpdt_{max}$. **A:** 3-HPPA (n = 5), **B:** 3,4-DHPA (n = 3) a **C:** 4-methylkatechol (n = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. čas 0.



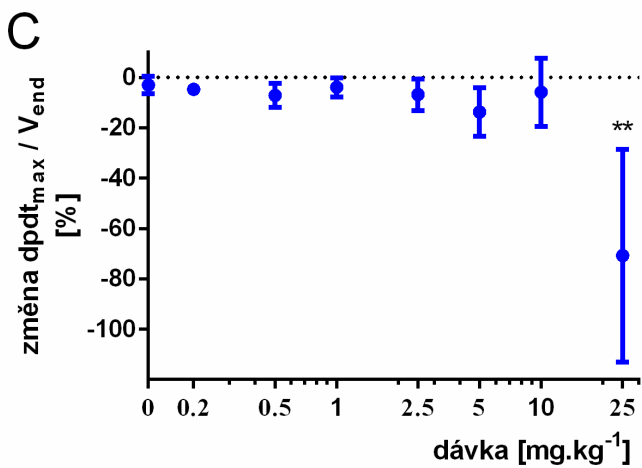
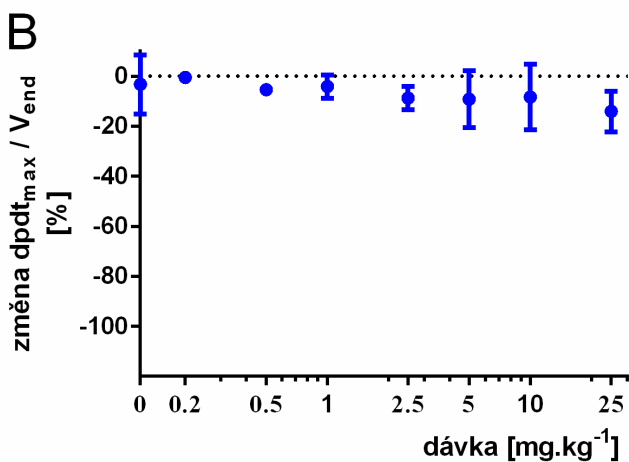
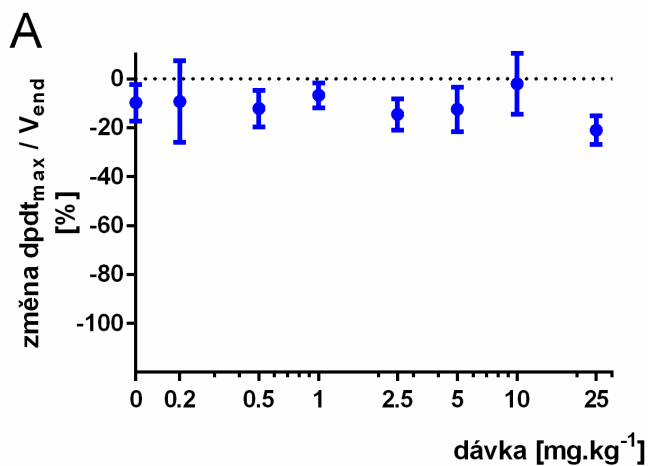
Obr. 37. Vliv různých dávek testovaných metabolitů na dpdt_{min}. **A:** 3-HPPA (n = 5), **B:** 3,4-DHPA (n = 3) a **C:** 4-methylcatechol (n = 3). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 vs. čas 0.

Tyto jednoduché parametry kontrakce a relaxace jsou ale závislé na změnách v objemu krve a tlaku v levé komoře (Kass *et al.* 1987) a tedy mohou odrážet i změny v periférii (jako snížení návratu krve do srdce, zvýšený nebo snížený odpor periferního řečiště). Pro omezení těchto vlivů na parametr kontrakce se ukázalo jako vhodné vydělit $dpdt_{\max}$ objemem krve na konci diastoly (V_{end}) nebo tlakem, při kterém je dosaženo maximální rychlosti vzestupu tlaku ($dpdt_{\max}$) p_{\max} . Oba tyto postupy ukázaly, že kontraktilita není testovanými látkami ovlivněna snad s výjimkou nejvyšší dávky 4-methylkatecholu (Obr. 38 a 39).

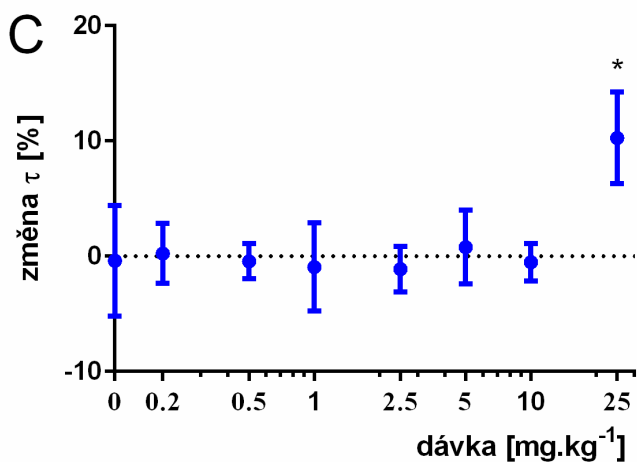
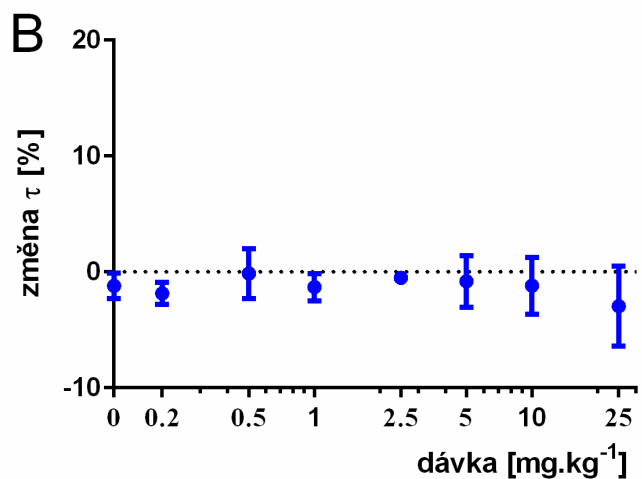
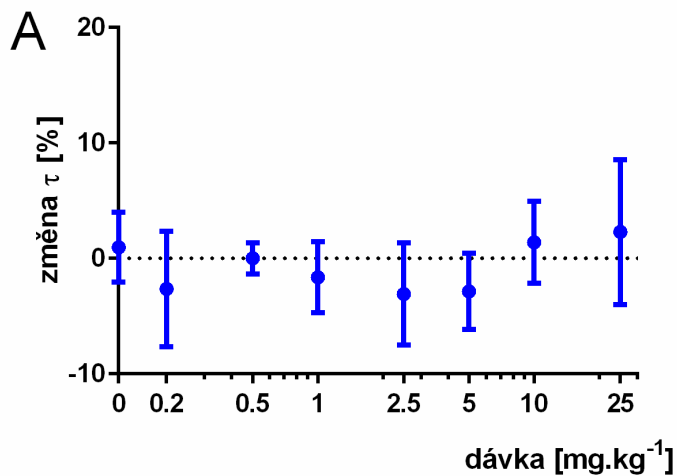
V případě relaxace nejsou podobné kalkulace dostatečné a je třeba použít velmi sofistikovaný matematický přístup. Výsledkem je stanovení hodnoty τ , tedy časové konstanty poklesu tlaku v isovolumické fázi (Weiss *et al.* 1976). I zde se ukázalo, že testované látky neovlivňují relaxaci levé komory u potkanů s výjimkou nejvyšší dávky 4-methykatecholu (Obr. 40)



Obr. 38. Vliv různých dávek testovaných metabolitů na $dpdt_{max}$ vydělený hodnotou tlaku dosaženou v tomto maximu. **A:** 3-HPPA ($n = 5$), **B:** 3,4-DHPA ($n = 3$) a **C:** 4-methylcatechol ($n = 3$).



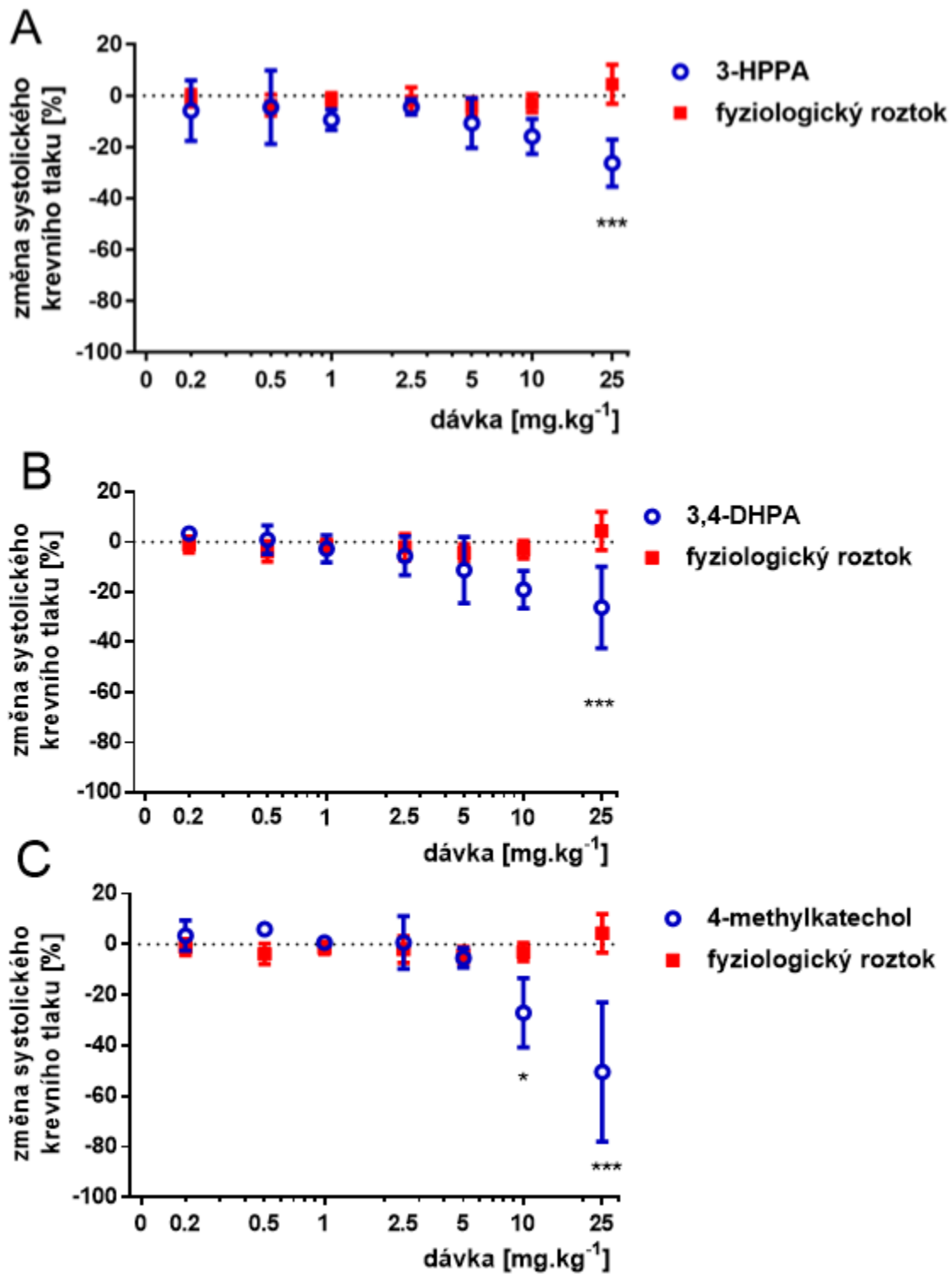
Obr. 39. Vliv různých dávek testovaných metabolitů na $dpdt_{max}$ vydělený hodnotou objemu na konci diastoly. **A:** 3-HPPA (n = 5), **B:** 3,4-DHPA (n = 3) a **C:** 4-methylcatechol (n = 3). ** p<0.01 vs. čas 0.



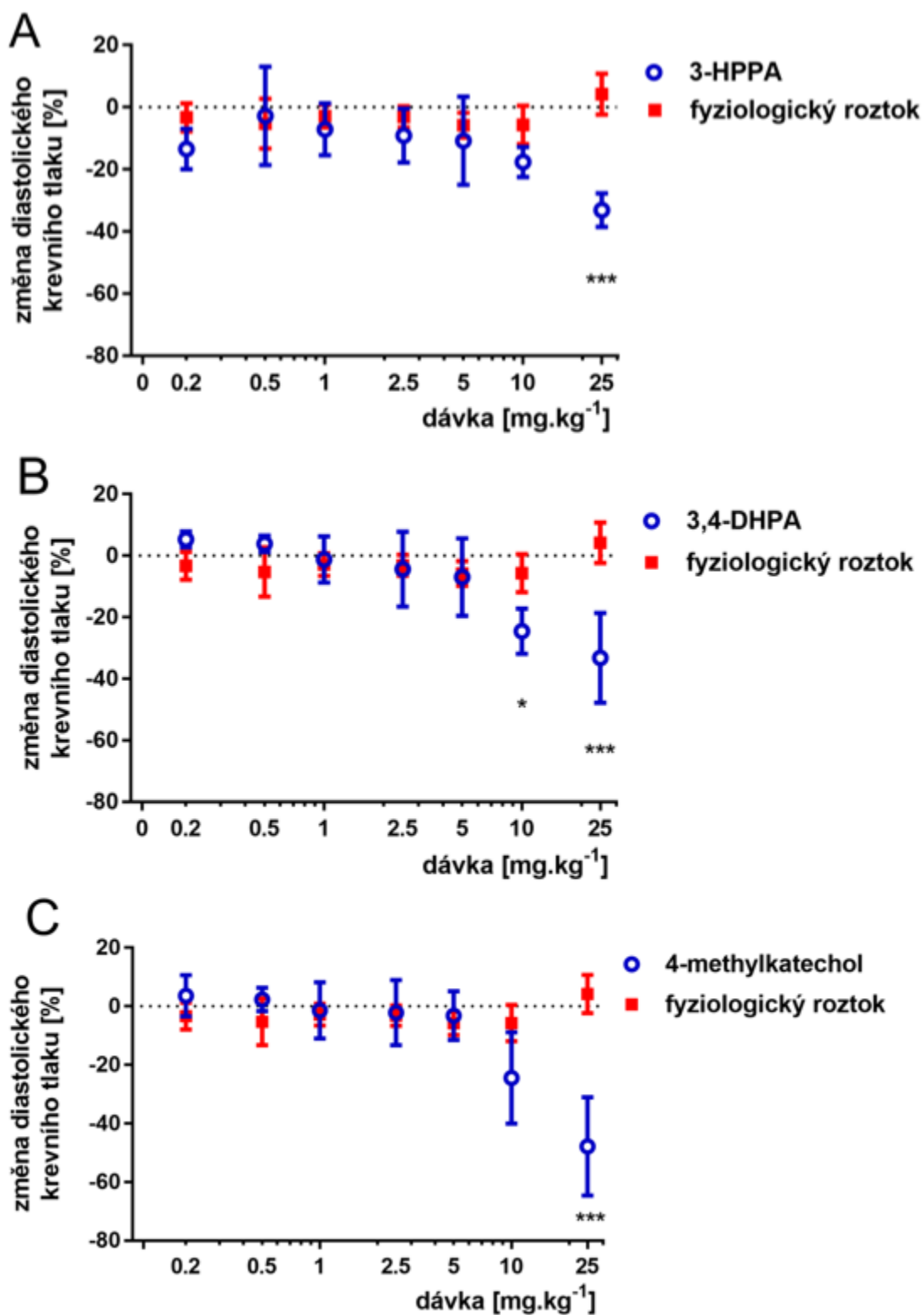
Obr. 40. Vliv různých dávek testovaných metabolitů na parametr relaxace t (Weissova metoda). **A:** 3-HPPA ($n = 5$), **B:** 3,4-DHPA ($n = 3$) a **C:** 4-methylcatechol ($n = 3$). * $p < 0.05$ vs. čas 0.

4.6.2 Ovlivnění účinku noradrenalinu

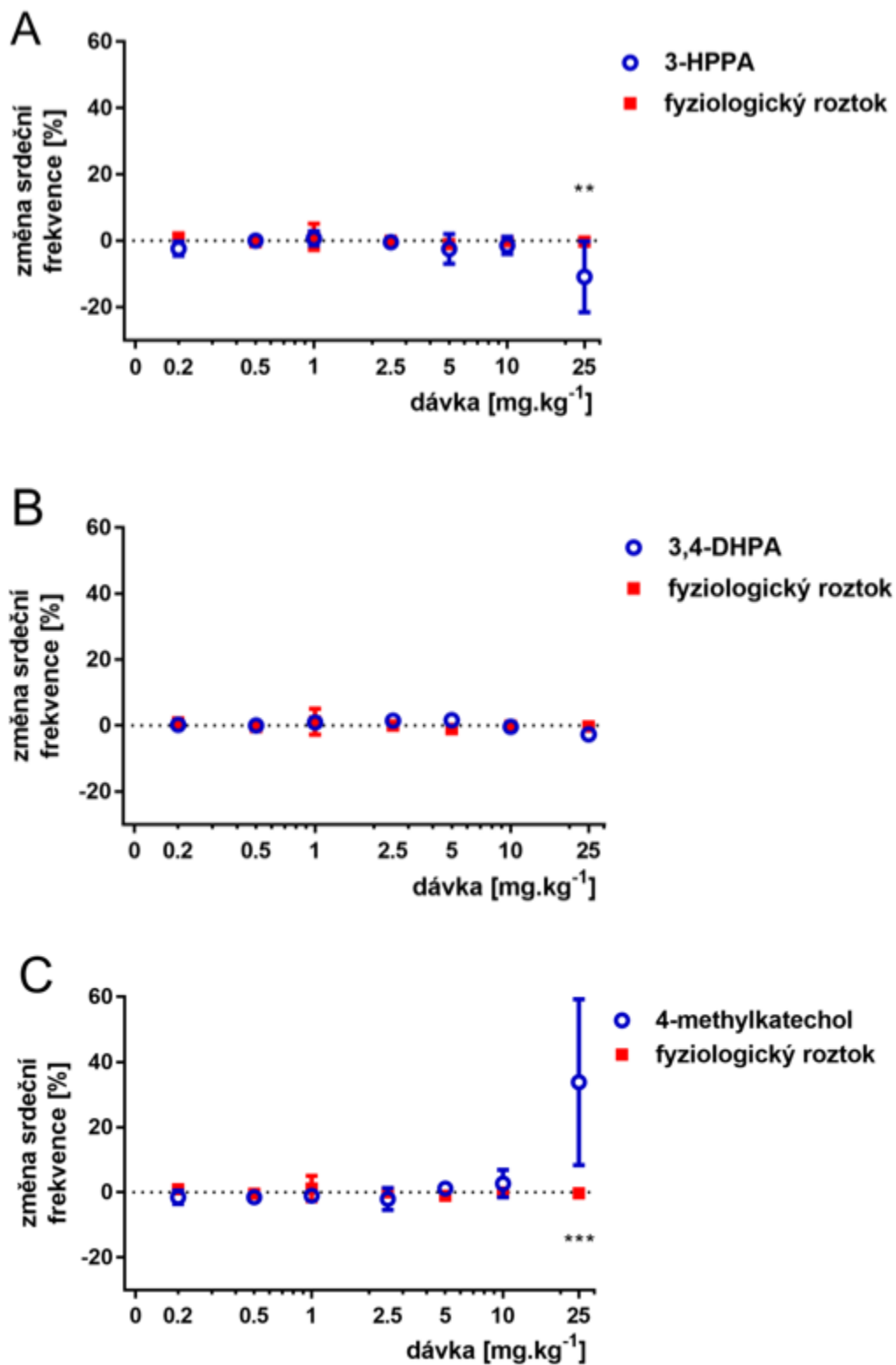
Účinky všech tří metabolitů byly testovány na Wistar:Han potkanech, kterým byly aplikovány dávky NA. Následně byl sledován vliv účinných metabolitů na krevní tlak. V souladu s přechozími výsledky, aplikace testovaných látek před noradrenalinem vedly k poklesu arteriálního krevního tlaku (Obr. 41 - 42) bez vlivu na srdeční frekvenci s výjimkou nejvyšších dávek 3-HPPA a 4-methylkatecholu (Obr. 43). Na druhé straně ale tyto testované látky nezabránilly vzestupu krevního tlaku a srdeční frekvence po podání noradrenalinu (Obr. 44 - 46).



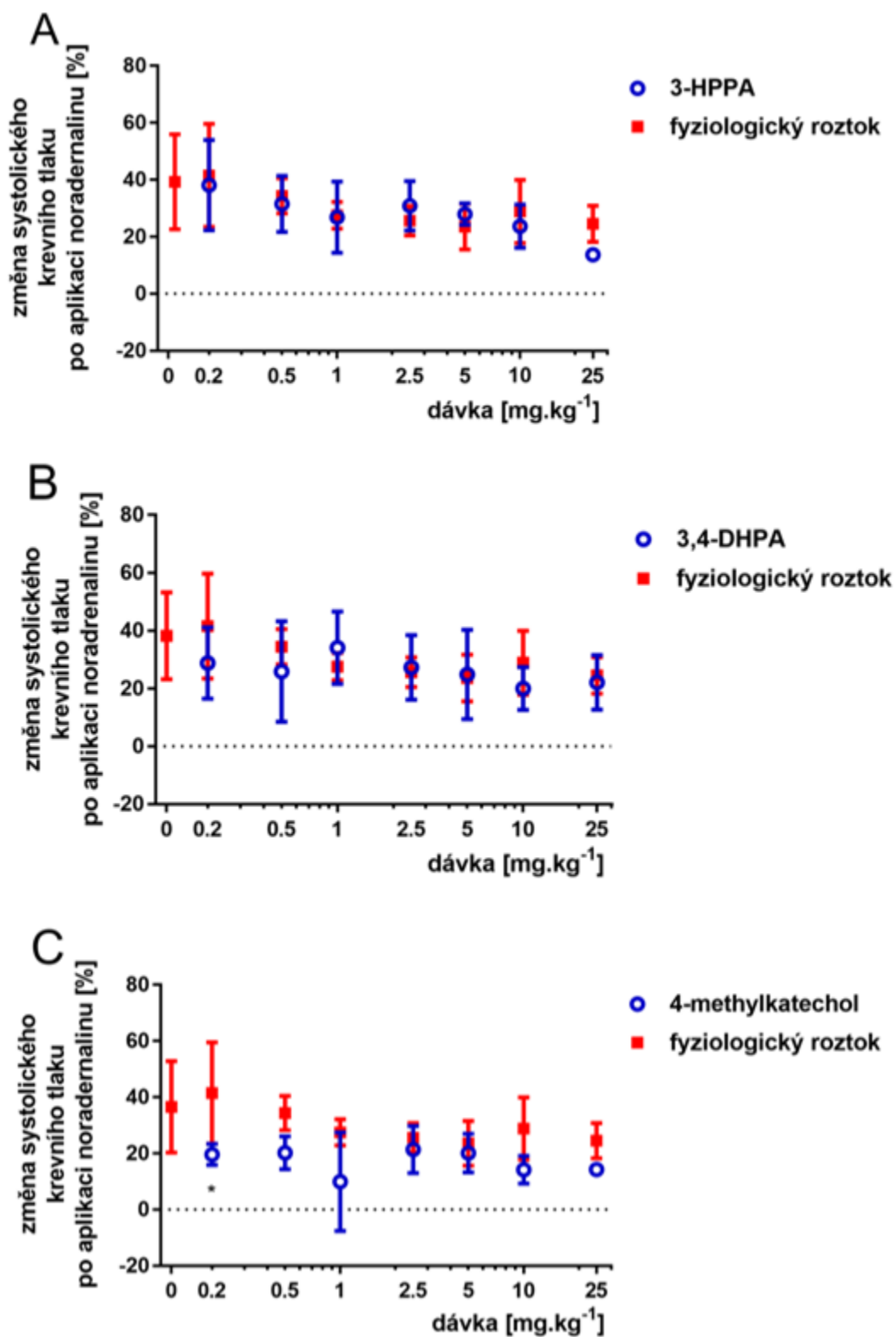
Obr. 41. Změna systolického krevního tlaku po aplikaci 3-HPPA (A), 3,4-DHPA (B) a 4-methylcatecholu (C). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. fyziologický roztok. Data jsou prezentována jako průměr z 3 – 5 měření \pm SD.



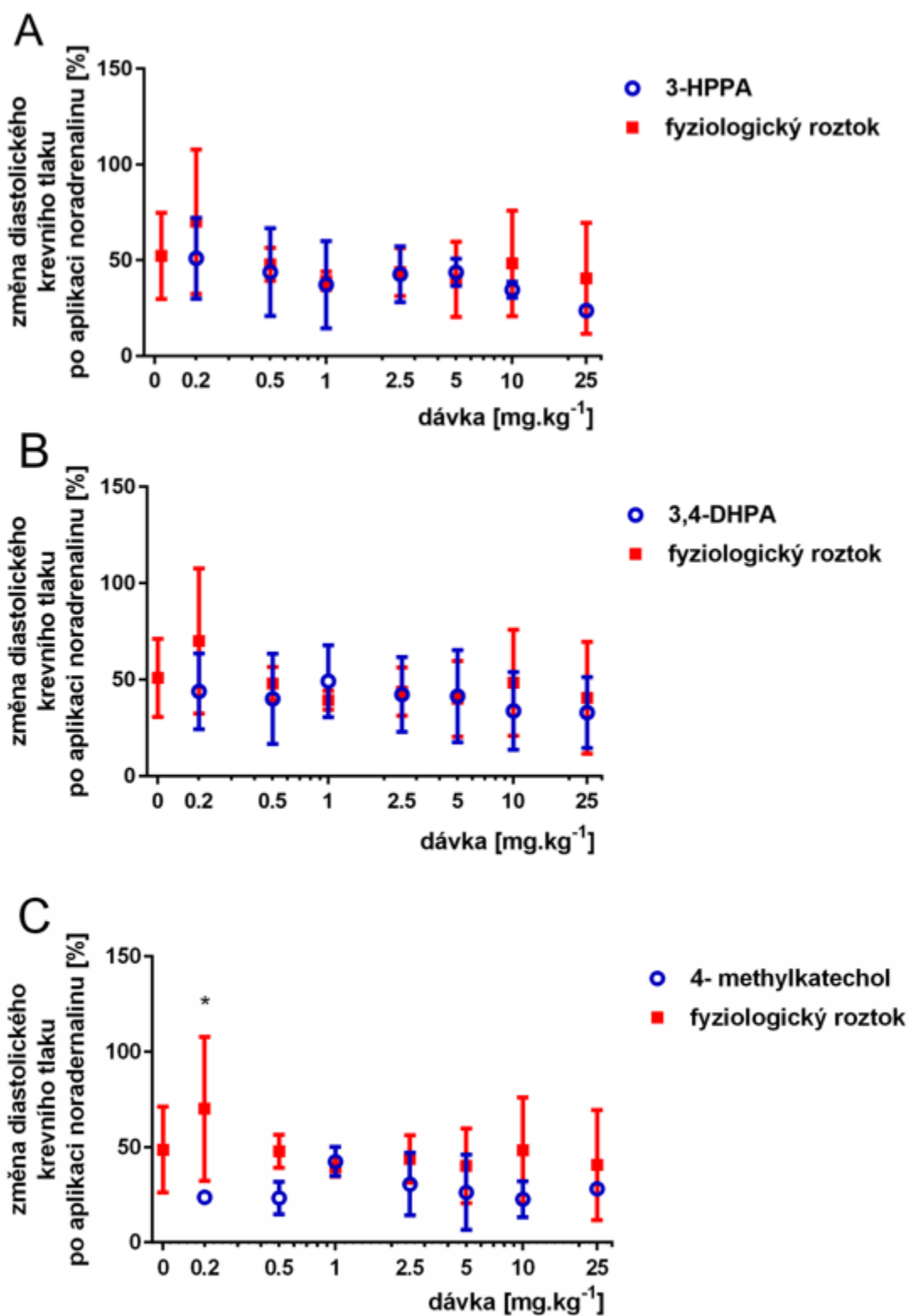
Obr. 42. Změna diastolického krevního tlaku po aplikaci 3-HPPA (A), 3,4-DHPA (B) a 4-methylcatecholu (C). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. fyziologický roztok. Data jsou prezentována jako průměr z 3 – 5 měření \pm SD.



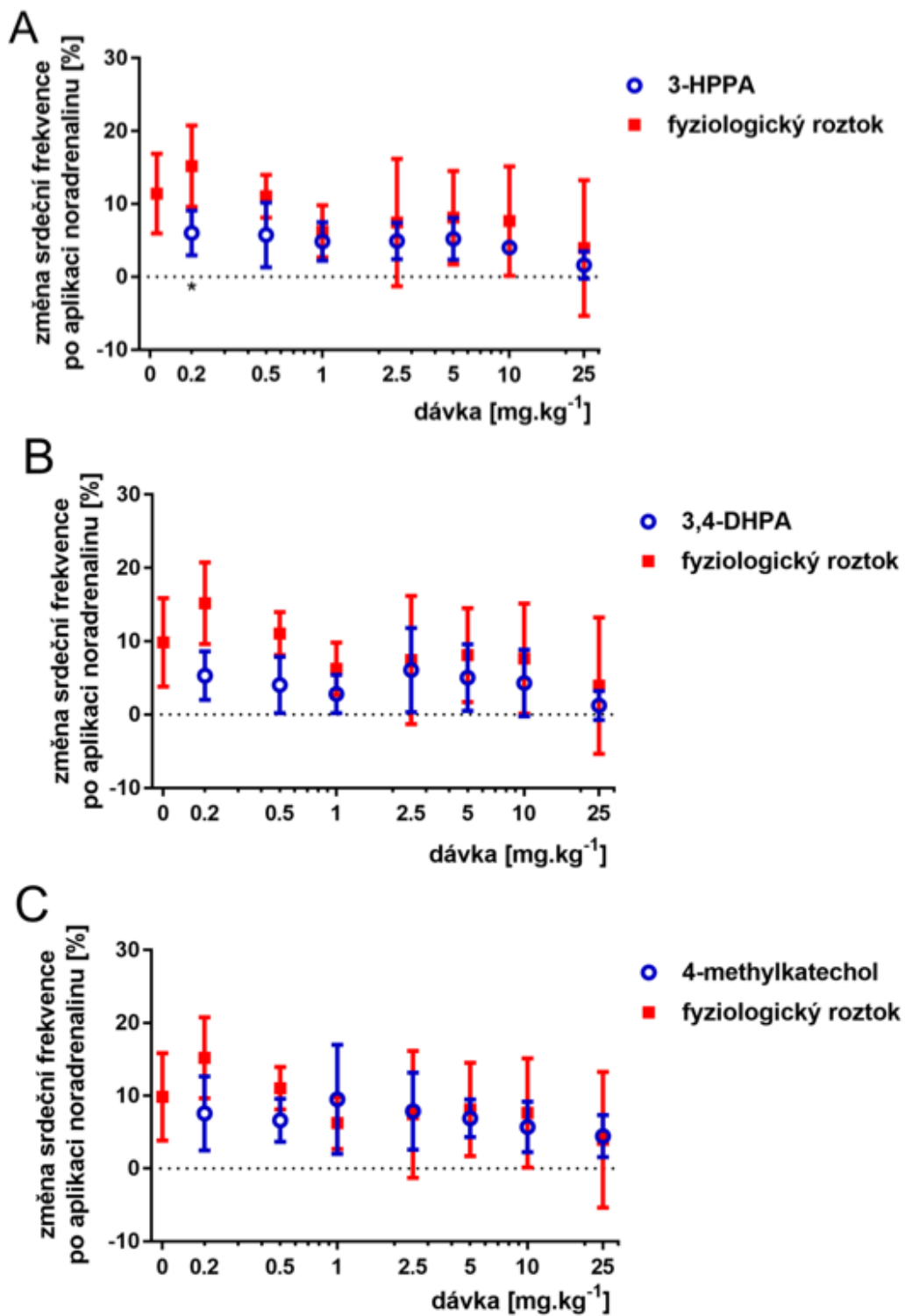
Obr. 43. Změna srdeční frekvence způsobená podáním 3-HPPA (A), 3,4-DHPA (B) a 4-methylcatecholu (C). ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ vs. fyziologický roztok. Data jsou prezentována jako průměr z 3 – 5 měření \pm SD.**



Obr. 44. Vliv metabolitů na vzestup systolického tlaku krve po aplikaci noradrenalinu v dávce 500 ng/kg. 3-HPPA (A), 3,4-DHPA (B) a 4-methylcatechol (C). * $p < 0.05$ vs. fyziologický roztok. Data jsou prezentována jako průměr z 3 – 5 měření \pm SD.



Obr. 45. Vliv metabolitů kvercetinů na vzestup diastolického krevního tlaku po podání noradrenalinu v dávce 500 ng/kg. 3-HPPA (A), 3,4-DHPA (B) a 4-methylcatechol (C). * $p < 0.05$ vs. fyziologický roztok. Data jsou prezentována jako průměr z 3 – 5 měření \pm SD.

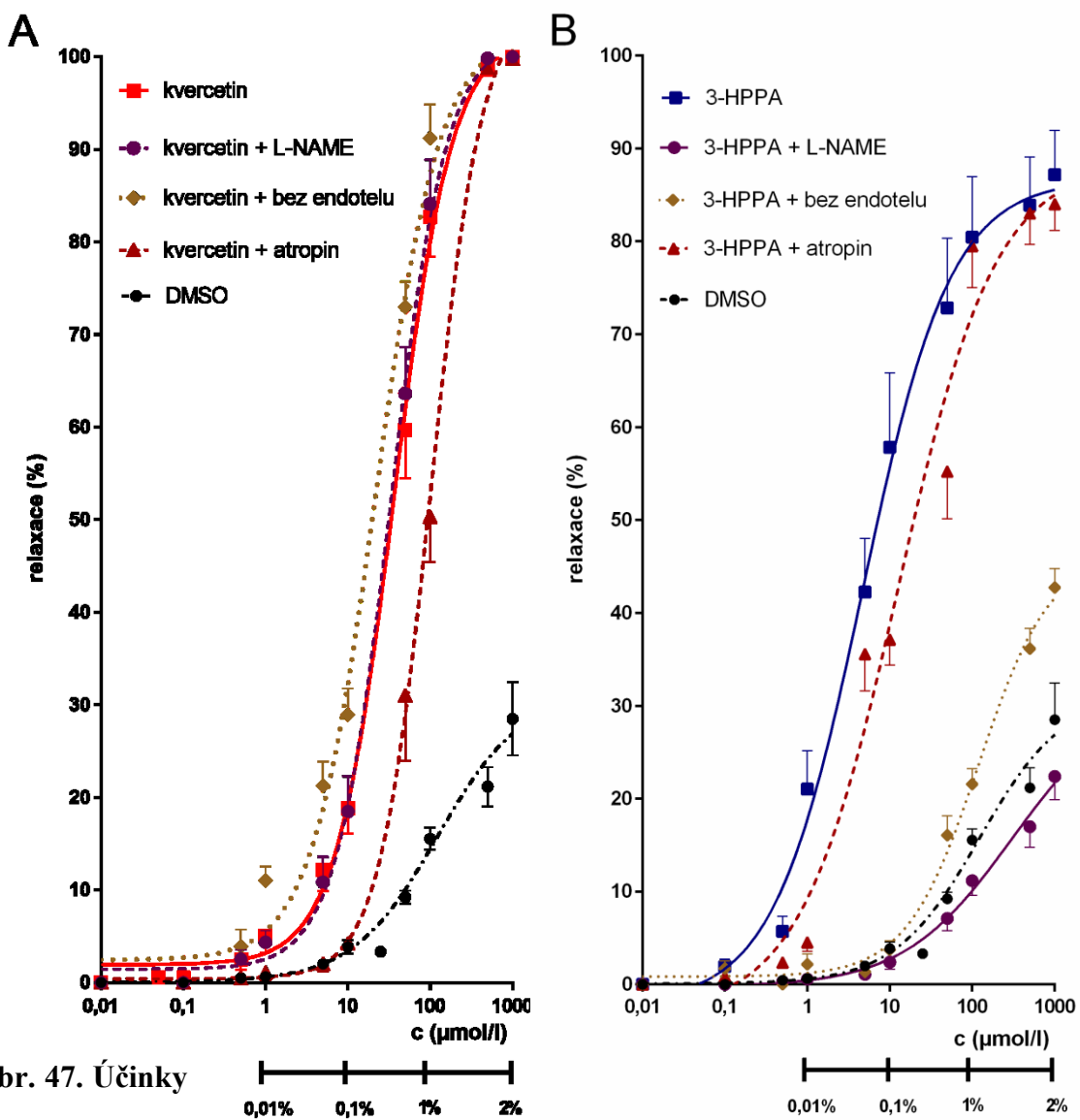


Obr. 46. Změna srdeční frekvence po aplikaci noradrenalinu v dávce 500 ng/kg. 3-HPPA (A), 3,4-DHPA (B) a 4-methylcatechol (C). * $p < 0.05$ vs. fyziologický roztok. Data jsou prezentována jako průměr z 3 – 5 měření \pm SD.

4.7 Bod 7 - Zjištění mechanismu účinku 3 účinných metabolitů v potkaní aortě

Testování mechanismu účinku proběhlo na 3-HPPA, 3,4-DHPA a 4-methylkatecholu. Pro porovnání byl do studie zařazen také kvercetin. Experimenty zahrnovaly cévy s endotelem i bez něj a za přítomnosti L-NAME a/nebo atropinu (Obr. 47-48). Rozpouštědlem byl stejně jako v předchozích případech DMSO v Krebsově roztoku.

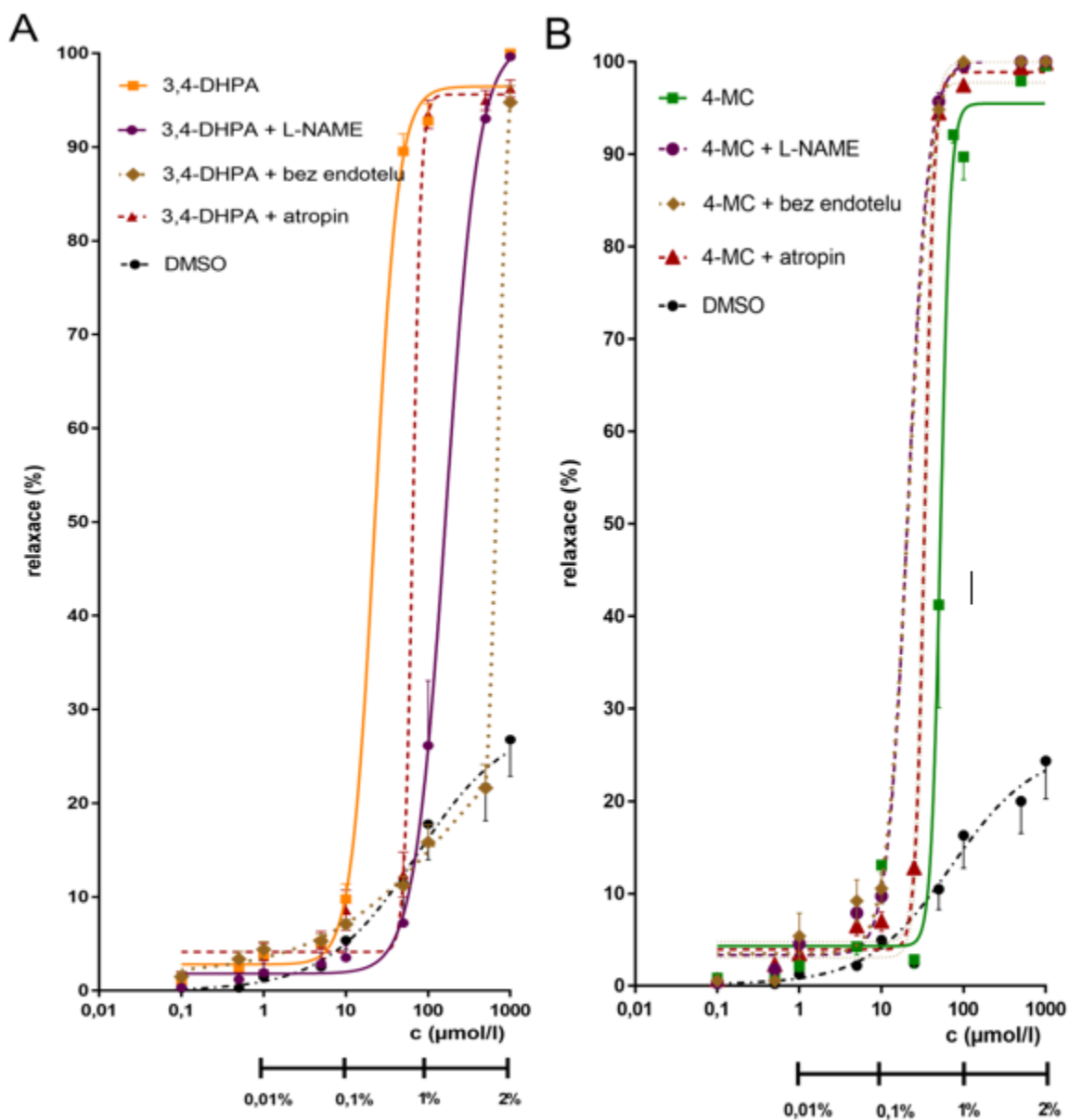
Nejprve byly testovány vasorelaxační účinky s ohledem na endotel. Při jeho odstranění nedošlo k žádné změně vasorelaxačního účinku u kvercetinu. Křivky relaxace u cévy s a bez endotelu byly v tomto případě téměř totožné. K výraznějšímu posunu křivky směrem doprava došlo u 3,4-DHPA, maximální velikost relaxace však ovlivněna nebyla. Jinak tomu bylo u 4-methylkatecholu, kde došlo překvapivě k menšímu posunu křivky doleva, což znamená, látka byla schopna navodit relaxaci již při nižší koncentraci. U 3-HPPA došlo naopak k výrazné inhibici vasorelaxačního účinku. Pro zjištění, zda byl vasorelaxační účinek 3-HPPA zprostředkován NO, byla jeho produkce zablokována L-NAME, inhibitorem NO syntázy. V případě 3-HPPA došlo znovu k výraznému poklesu účinku. Výrazně menší pokles dilatace byl pozorován u 3,4-DHPA. V případě 4-methylkatecholu byla křivka opět posunuta doleva a kopírovala křivku vasorelaxace cévy bez endotelu. Zjišťováno také bylo, zda nedochází k vasorelaxaci prostřednictvím muskarinových receptorů, jejichž stimulace vede k uvolnění NO. To je však nepravděpodobné, neboť jejich zablokování atropinem mělo jen malý vliv a vedlo pouze k mírnému posunutí křivky vpravo u většiny testovaných látek.



Obr. 47. Účinky

kvercetinu (A) a 3-HPPA (B) na cévách

kontrahovaných noradrenalinem (10 μM). Mechanismus účinku byl testován na cévách bez endotelu, nebo za přítomnosti inhibitoru NO syntázy (L-NAME) či antagonisty muskarinových receptorů (atropin). Data jsou prezentována jako průměr ± SEM. Křivky jsou tvořeny průměrem z 5-9 měření.

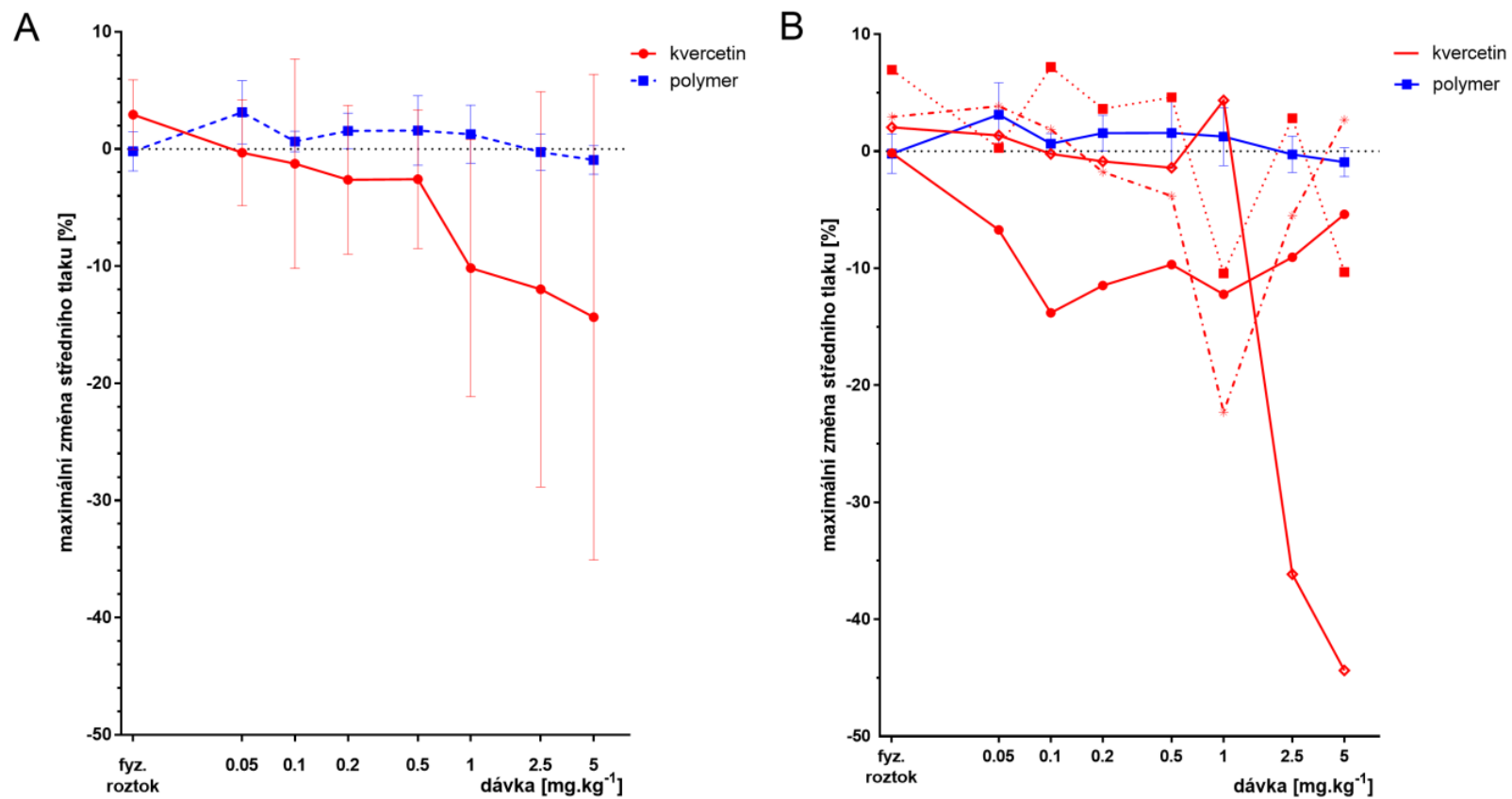


Obr. 48. Účinky 3,4-DHPA (A) a 4-methylcatecholu (4-MC) (B) na cévách kontrahovaných noradrenalinem (10 μM). Mechanismus účinku byl testován na cévách bez endotelu, nebo za přítomnosti inhibitoru NO syntázy (L-NAME) či antagonisty muskarinových receptorů (atropin). Data jsou prezentována jako průměr \pm SEM. Křivky jsou tvořeny průměrem z 3 - 8 měření.

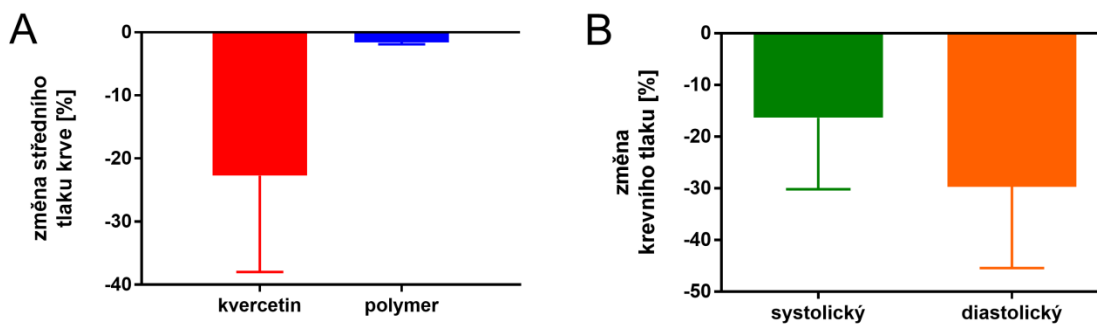
4.8 Bod 8 - Ověření účinku kvercetinu a jeho metabolitu kvercetinu-3-O-glukuronidu na potkanech

4.8.1 Podání kvercetinu i.v. potkanům

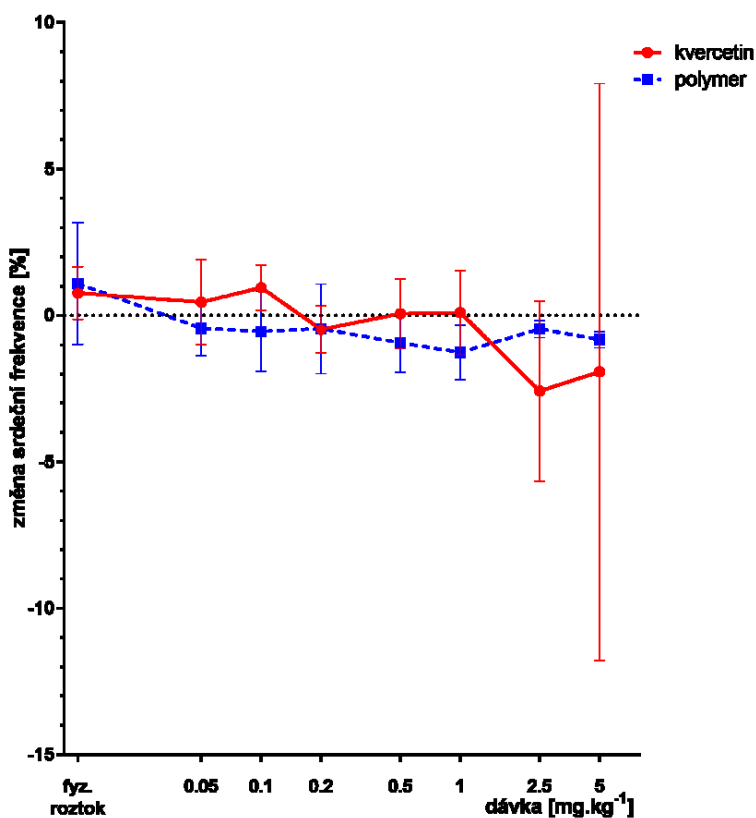
Po podání jednotlivých bolusových dávek kvercetinu došlo k poklesu tlaku krve, tento pokles je však dávkově velmi variabilní (Obr. 49). Porovnáme-li nejvyšší dosažený pokles krevního tlaku (Obr. 50A), rozdíly vypadají výrazněji, a to zejména vzhledem k minimálnímu vlivu kontrolního polymeru na krevní tlak. Vzhledem k malému počtu zvířat, zejména kontrol, však nebyla provedena statistická analýza. Podle této předběžné analýzy lze usuzovat na periferní účinky, pokles diastolického krevního tlaku byl totiž výraznější než u systolického (Obr. 50B). Srdeční frekvence nebyla významně ovlivněna ani podání kontrolního polymeru ani kvercetinu (Obr. 51).



Obr. 49. Procentuální změna tlaku krve po aplikaci jednotlivých dávek kvercetinu vázaného na polymer a polymeru samotného. Změna středního tlaku krve, průměrné hodnoty ze 4 měření ± SD (kvercetin) a 2 měření ± SD (polymer) (A). Změny tlaku krve u jednotlivých potkanů (kontrolní polymer vzhledem k minimálnímu vlivu je zobrazen jako průměr ± SD) (B).



Obr. 50. Maximální pokles arteriálního krevního tlaku. Porovnání změn středního tlaku krve po aplikaci kvercetinu a polymeru (**A**). Porovnání změny systolického a diastolického tlaku krve po aplikaci kvercetinu (**B**).

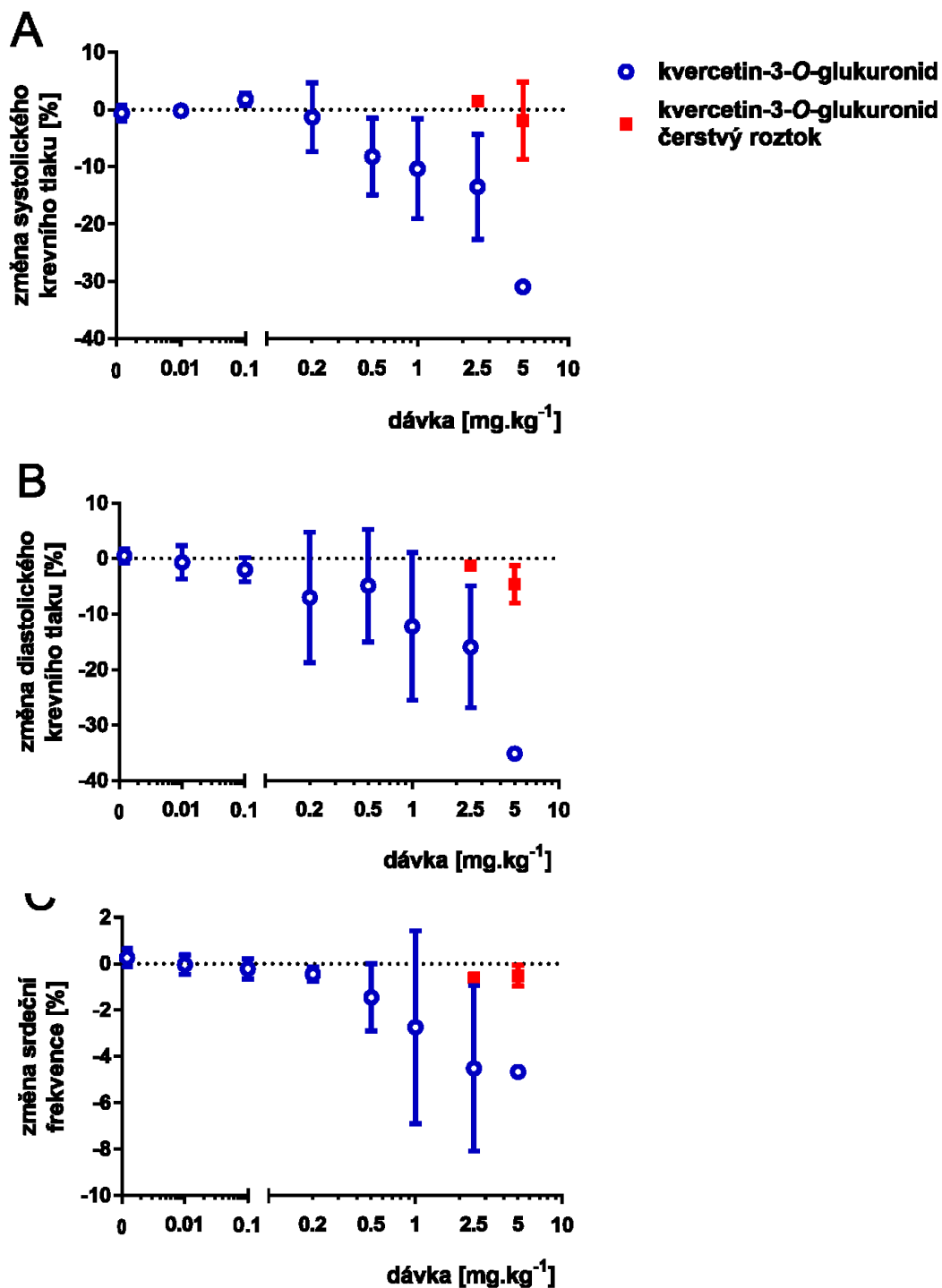


Obr. 51 Změna srdeční frekvence po aplikaci kvercetinu a polymeru. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ze 4 (kvercetin) a 2 (polymer) měření \pm SD.

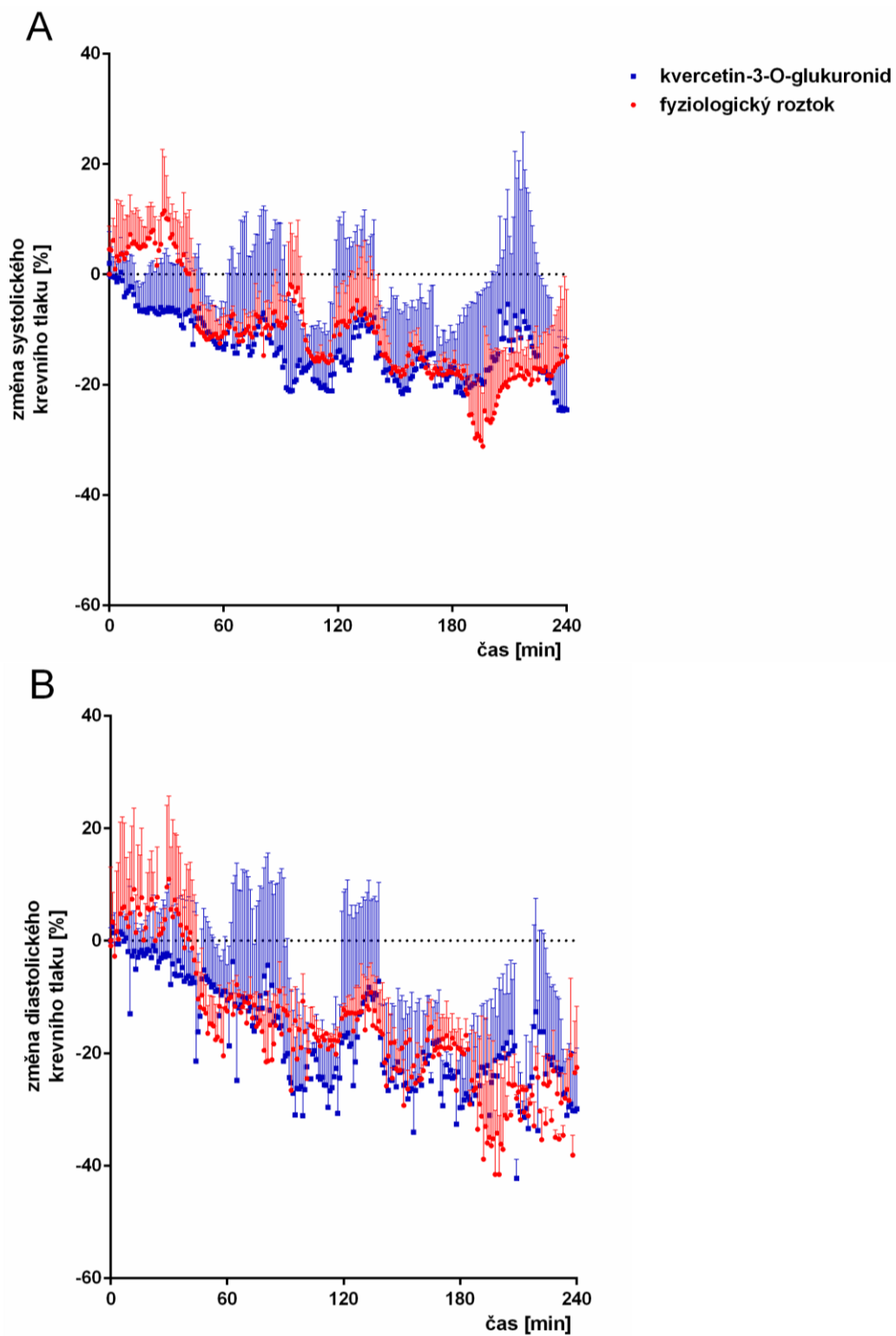
4.8.2 Podání kvercetin-3-O-glukuronidu potkanům i.v.

Po aplikaci roztoků kvercetin-3-O-glukuronidu, které byly připraveny před započítím samotného experimentu, došlo k postupnému snižování jak systolického, tak diastolického krevního tlaku. K tomuto poklesu ale nedošlo v případě, že byly nejvyšší dávky připraveny těsně před aplikací (Obr. 52). Jedním z možných vysvětlení je rozklad kvercetin-3-O-glukuronidu při dlouhodobém stání asi na kvercetin, který je zodpovědný za pokles arteriálního tlaku krve.

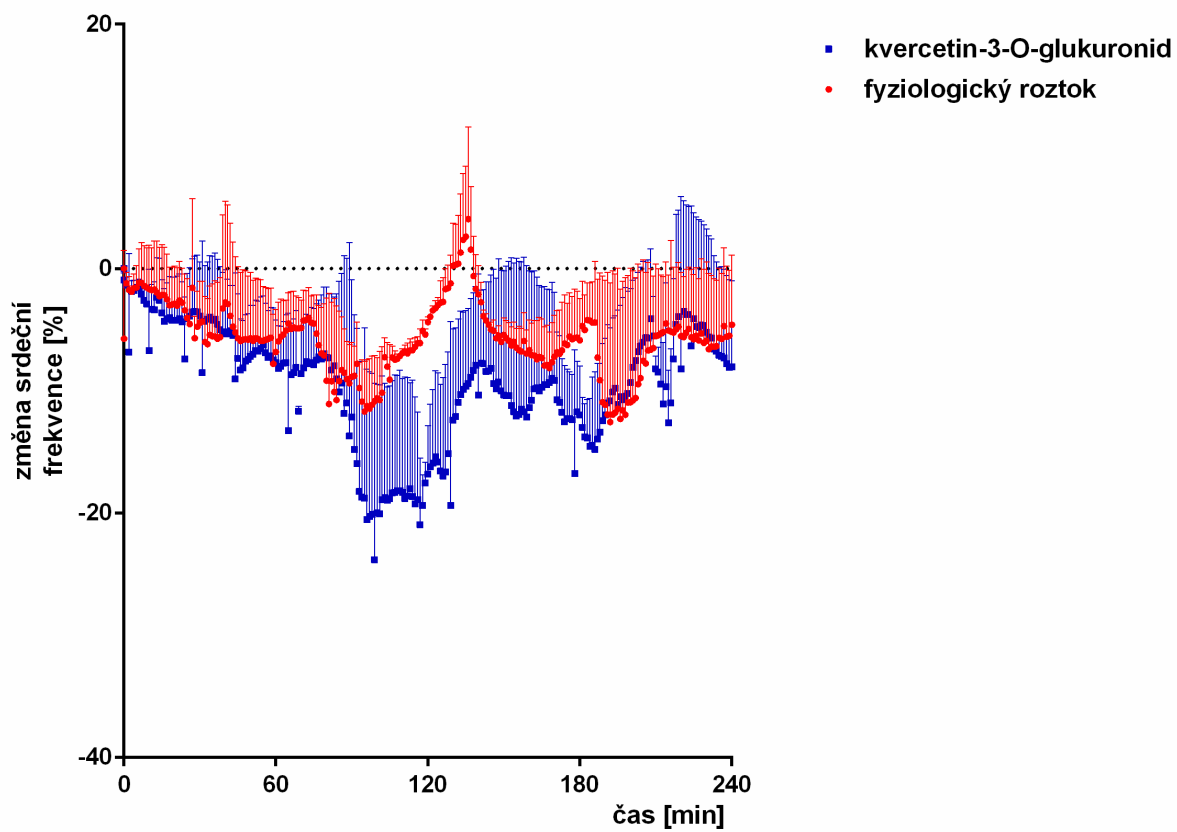
Vzhledem k předchozím výsledkům jiné skupiny jsme dále ověřili, zda i.v. podaný kvercetin-3-O-glukuronid, a to v dostatečné dávce 5 mg/kg může ovlivnit arteriální krevní tlak a srdeční frekvenci. Hodnoty byly sledovány po dobu 4 hodin. V průběhu došlo k pozvolnému snižování tlaku krve, které ale nebylo signifikantní, stejně tak srdeční frekvence nebyla změněna (Obr. 53 a 54).



Obr. 52. Změna systolického krevního tlaku (A), diastolického tlaku krve (B) a srdeční frekvence (C) po aplikaci bolusů kvercetin-3-O-glukuronidu, který byl připraven před započítím pokusu a kvercetinu-3-O-glukuronidu, který byl připraven těsně před aplikací. Data jsou prezentována jako průměr \pm SD. Měření bylo provedeno na 1 - 3 potkanech (viz metodická část).



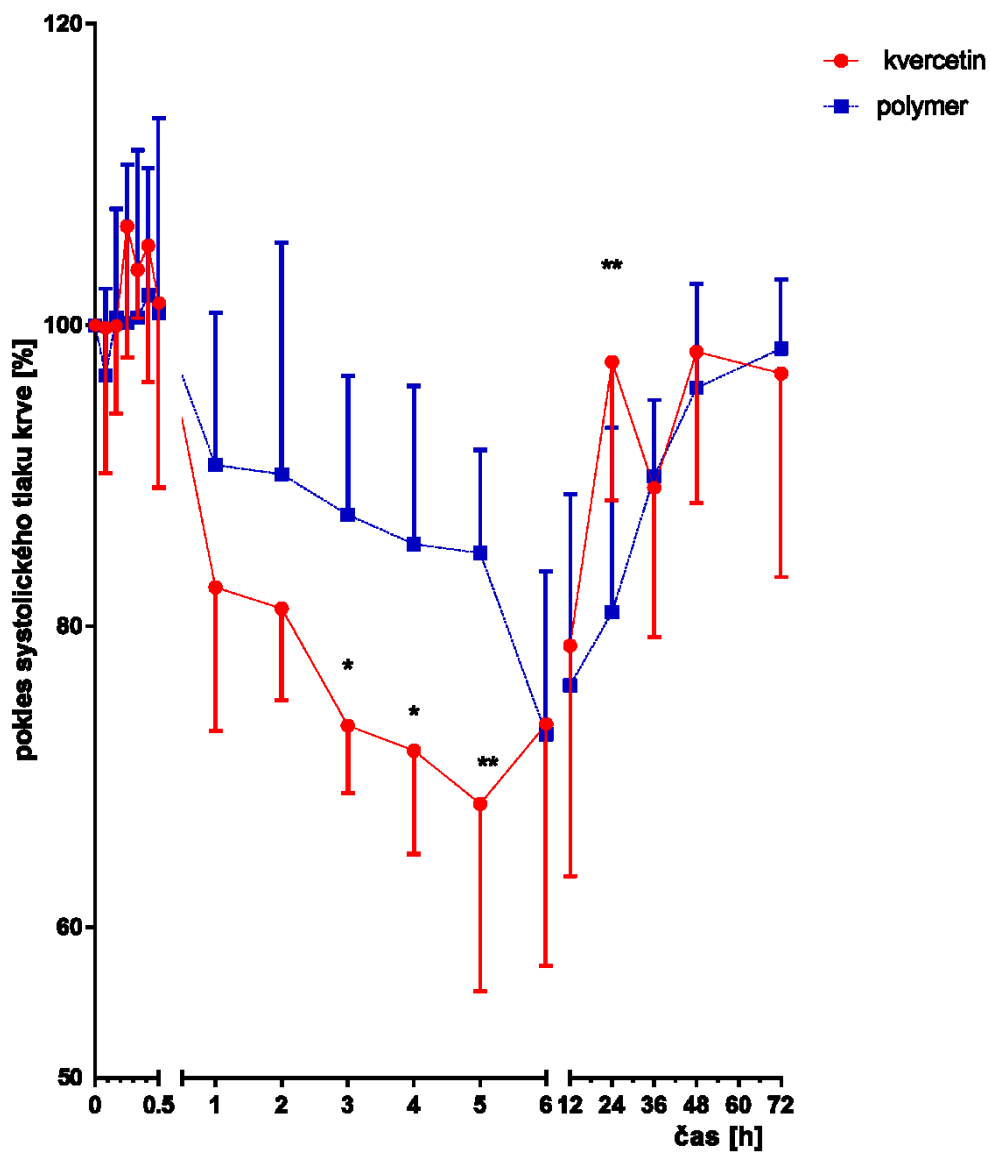
Obr. 53. Dlouhodobý vliv na systolický tlak krve (A) a diastolický tlak krve (B) po aplikaci 5 mg/kg kvercetin-3-O-glukuronidu. Data jsou prezentována jako průměr \pm SD. Měření bylo provedeno na 6 potkanech (po třech v každé skupině).



Obr. 54. Dlouhodobý vliv na srdeční frekvenci po aplikaci 5 mg/kg kvercetin-3-O-glukuronidu. Data jsou prezentována jako průměr \pm SD. Měření bylo provedeno na 6 potkanech (po třech v každé skupině).

4.8.3 Neinvazivní měření krevního tlaku po i.v. aplikaci kvercetinu vázaného na polymer

Po i.v. aplikaci 5 mg/kg kvercetinu vázaného na polymer se začalo ihned s měřením systolického tlaku krve. V průběhu prvních 30ti minut nebyl zaznamenán významný pokles tlaku krve a to zřejmě v důsledku stresové reakce na i.v. aplikaci. Od 30. minuty začal systolický tlak klesat. Pokles byl signifikantní zejména mezi 3 – 5. hodinou, kdy poklesl až o 30%, a poté se začal tlak opět stoupat do původní hodnoty (Obr. 55).



Obr. 55 Záznam změn systolického tlaku po aplikaci 5 mg/kg kvercetinu navázaného na polymer. Křivky jsou zobrazeny jako průměry z 6 měření ± SD.

5. Diskuze

Polyfenolické látky jsou důležitou součástí lidské stravy a mají mnoho zdraví potenciálně prospěšných vlivů na lidský organismus. Jedním z nich je i kardioprotektivní účinek, který byl sledován v několika epidemiologických studiích. Jednou z prvních byla Zutphen studie, která probíhala v letech 1985 až 1990 a zjistila nižší úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění a nižší výskyt infarktů myokardu u osob se zvýšeným příjmem flavonoidů ve stravě (Hertog *et al.* 1993a). Protože hlavním přijímaným flavonoidem byl stanoven kvercetin, zaměřilo se množství pozdějších studií na jeho kardiovaskulární účinky.

Antihypertenzní účinky kvercetinu byly ve většině případů stanoveny po podání jeho aglykonu, přestože se v přírodě vyskytuje ve valné většině jako glykosid. Jak už bylo zmíněno dříve, přestupují právě glykosidy kvercetinu do enterocytů tenkého střeva lépe než aglykon samotný (Crespy *et al.* 2002). Ať už se do enterocytů dostanou glykosidy nebo samotný aglykon, do systémové cirkulace se tyto látky dostávají až po metabolizaci za vzniku methylderivátů nebo glukuronidů, popřípadě sulfátů. Pokud nějaká molekula unikne metabolizaci ve stěně střeva, podstoupí metabolismus v játrech. V plasmě tedy nejsou detekovány žádné glykosidy kvercetinu a samotný aglykon může být detekován, ale jen ve velmi nízkých koncentracích.

Přestože již proběhlo několik studií zaměřených na vasodilatační účinky kvercetinu, jeho metabolitům byla věnována jen malá pozornost. Proběhlo zejména testování metabolitů prvního řádu, tzn. methylderivátů kvercetinu, isorhamnetinu a tamarixetinu, a dále byly testovány některé konjugáty - kvercetin-3-O-glukuronid a kvercetin-3'-sulfát. U nekonjugovaných methylderivátů byla stanovena přibližně stejná vasorelaxační účinnost na potkaních aortách jako u parentní látky (Galindo *et al.* 2012b; Ibarra *et al.* 2003; Ibarra *et al.*

2002; Perez-Vizcaino *et al.* 2002). Tyto výsledky se shodují i s našimi poznatky (Obr. 20), které vypovídají o stejné účinnosti v inhibici kontrakce vyvolané agonistou α_1 receptorů.

Konjugované deriváty kvercetin-3-O-glukuronid ani kvercetin-3'-sulfát nedokázaly vyvolat vasodilataci *in vitro*, ačkoli dlouhodobá inkubace cévy (1h) v prostředí s kvercetin-3-O-glukuronidem dokázala částečně inhibovat kontrakci vyvolanou fenylefrinem. Při i.v. podání tohoto glukuronidu v dávce 1 mg/kg SHR došlo po jedné hodině k signifikantnímu poklesu středního tlaku krve, a krevní tlak dále klesal dalších pět hodin. Autoři tohoto článku si vyvolaný pokles tlaku krve vysvětlují dekonjugací kvercetinu v endotelu cév a tím uvolnění aktivní látky, která způsobí vasodilataci (Galindo *et al.* 2012b).

Naše výsledky potvrdily v *in vitro* prostředí, že kvercetin-3-O-glukuronid neovlivňuje cévu prekontrahovavou noradrenalinem. Jeho vliv byl totiž víceméně srovnatelný s účinností rozpouštědla (Krebsův roztok s malým množstvím DMSO). Dlouhodobou preinkubací cév v roztoku s určitým metabolitem jsme netestovali, protože fyziologický význam takových pokusů není jasný nebo přesněji řečeno by si vyžádal také provedení důkladné farmakokinetické analýzy *in vivo*. Paradoxně jsme však zjistili zajímavé výsledky, kdy při i.v. podávání vzrůstajících bolusových dávek tohoto metabolitu (0,5 – 5 mg/kg) se zvětšoval v závislosti na aplikované dávce pokles arteriálního tlaku krve. Důvodem poklesu byl ale velmi pravděpodobně rozklad tohoto neúčinného metabolitu *in vitro* zřejmě na kvercetin, neboť roztoky, které byly v našem případě aplikovány, byly připraveny ještě před započítáním experimentu, a tedy zde mohlo při delším čekání dojít k rozkladu glukuronidu. Při jeho opětovném naředění těsně před aplikací, nebyl patrný žádný pokles tlaku. V současné době probíhá chemická analýza rozkladných produktů kvercetinu-3-O-glukuronidu ve fyziologickém roztoku (výsledky v době psaní této dizertace nebyly k dispozici). I z těchto důvodů nestability jsme se rozhodli vyzkoušet podání dávky 5 mg/kg kvercetinu-3-O-glukuronidu SHR potkanům, kterým jsme po dobu 4 hodin měřili arteriální krevní tlak i

srdeční frekvenci. V průběhu pokusu sice došlo k poklesu tlaku krve, ale tento pokles nebyl signifikantní, neboť tlak v kontrolní skupině klesal také. Dekonjugační teorii španělské výzkumné skupiny jsme tímto pokusem spíše zpochybnili.

Navíc stejná skupina sama nepřímo alespoň částečně vyvrátila své výsledky v jejich další studii, ve které byly porovnávány účinky kvercetinu na krevní tlak v závislosti na způsobu podání. Ve skupině potkanů, kterým byl aplikován kvercetin i.p., byla detekována vyšší koncentrace konjugátů kvercetinu, pokles tlaku byl ale nižší než při p.o podaném kvercetinu (Galindo *et al.* 2012a).

Tyto na první pohled zvláštní výsledky nám naznačily, že větší pokles arteriálního tlaku krve je způsoben jedním nebo více metabolity, které jsou tvořeny bakteriální mikroflórou v tlustém střevě. Tento předpoklad se nám potvrdil při otestování známých metabolitů kvercetinu na aortálních kroužcích potkana kontrahovaných noradrenalinem, kdy 3-HPPA relaxovala už při koncentraci 100 nM, zatímco kvercetin začal relaxovat až při koncentraci 500 nM. Dalšími účinnými metabolity byly také 3,4-DPHA a 4-methylkatechol. Ostatní testované metabolity působily relaxaci až při vyšších koncentracích a/nebo nezpůsobovaly 100% relaxaci.

Účinnost těchto tří metabolitů jsme testovali nejen na pružnickové cévě, ale zkoušeli jsme jejich vasodilatační vlastnosti na kontrahované primární mesenterické odporové arterii. Protože odporové cévy obsahují více hladké svaloviny než pružnickové, očekávali jsme navození relaxace za nižších koncentrací metabolitu. To se však nestalo v případě 3-HPPA, jejíž křivka byla posunuta výrazně doprava a látka navíc nebyla schopna navodit ani maximální relaxaci. Naopak 3,4-DHPA a 4-methylkatechol, které byly zhruba o řád méně účinné než 3-HPPA na aortě, byly naopak o řád účinnější na mesenterické arterii a dosáhly i 100% relaxace.

Při studiu mechanismu účinku kvercetinů a jeho tří účinných metabolitů, bylo zjištěno, že odstranění endotelu nemá vliv na relaxaci způsobenou kvercetinem, stejně tak jako použití inhibitoru NO syntázy a antagonisty muskarinových receptorů. Účinek kvercetinů je tedy na endotelu nezávislý, alespoň podle našich výsledků. Jinak tomu je u 3-HPPA, kdy křivka v přítomnosti inhibitoru NO-syntázy L-NAME nebo při odstranění endotelu byla posunuta doprava. Stejně tomu bylo i u 3,4-DHPA. V druhém případě nebyla relaxace až tak výrazně redukována, což naznačuje i určitý vasorelaxační účinek na endotelu nezávislý. 4-methylkatechol se za použití inhibitorů či odstranění endotelu choval jinak a křivka relaxace byla dokonce mírně posunuta doleva, a tudíž jsou jeho vasorelaxační účinky zcela nezávislé na endotelu. Atropin neměl na relaxaci žádného z testovaných metabolitů výrazný vliv a muskarinové receptory nehrají tedy velmi pravděpodobně v jejich účinku žádnou úlohu.

In vivo byly testovány tři nejúčinnější metabolity a sledoval se jejich antihypertenzní účinek. Při aplikaci bolusových dávek SHR došlo k signifikantním poklesům arteriálního tlaku, který byl markantní zejména u 4-methylkatecholu. Tyto poklesy arteriálního tlaku krve byly pouze krátkodobé a krevní tlak byl rychle normalizován. Abychom navodili stav podobný dlouhodobějšímu vstřebávání metabolitu ze střev, aplikovali jsme metabolity ve formě krátkodobé (5 minutové) infúze. Jak jsme očekávali, došlo i v tomto případě k poklesu arteriálního krevního tlaku a když jsme zejména u 3-HPPA pozorovali dávkově závislý pokles, bylo toto snížení významné oproti kontrole až při nejvyšší dávce infúze (5 mg/kg/50 μ l/min). Pokles navíc netrval po celou dobu aplikace infúze a tlak krve byl opět postupně normalizován ještě před ukončením aplikace. Nejrychleji nastoupil účinek při aplikaci 3,4-DHPA a tento pokles tlaku krve trval nejdéle. Zajímavé je, že u této látky došlo ještě k druhému poklesu a to po čtyřech minutách, trval však kratší dobu. 3-HPPA způsobila pozvolný pokles tlaku krve od první minuty s maximem po 90 sekundách, poté byl tlak pomalu vyrovnán. Nejméně účinný byl z tohoto pohledu 4-methylkatechol, který navodil

pozvolný pokles, který se objevil po dvou minutách od začátku aplikace především u systolického tlaku, u diastolického tlaku byl pokles méně razantní a signifikantní pouze velmi krátkou dobu.

Tyto výsledky, zejména pouze krátkodobý pokles, krevního tlaku mohou vzbuzovat určité pochyby, zda jsou tyto účinky relevantní v klinických podmínkách. Ze současných výsledků to nelze ani potvrdit ani zcela vyvrátit. Bude nutné pokračovat ve studiu účinku těchto látek. Je totiž možné, že jednotlivé látky mají samostatně opravdu jen krátkodobý účinek na krevní tlak, ale jejich kombinace může mít účinek aditivní a/nebo synergistický. Z tohoto pohledu se jako nejzajímavější jeví kombinace 4-methylkatecholu, který má na endotelu nezávislé účinky, s nějakým dalším metabolitem, jehož účinky jsou alespoň částečně závislé na endotelu. Je také možné, že náš model (invazivní podání v celkové anestezii) není schopen plně predikovat situaci *in vivo* a tyto metabolity mohou mít malý, ale signifikantní vliv na krevní tlak. Podobné kontroverze jsou známy u isoflavonoidů, které snižují krevní tlak u zvířat (Cao *et al.* 2006) a jeví se sice relativně málo ale signifikantně snižovat krevní tlak také u lidí při jejich zvýšeném příjmu (např. soji) (Crouse *et al.* 1999; Sagara *et al.* 2004) .

Je také nutné zohlednit, zda námi podávané dávky metabolitů jsou klinicky relevantní. Zatím nemáme dokončené všechny farmakokinetické experimenty zahrnující mj. stanovení maximálních koncentrací podaných metabolitů v plasmě, avšak dostupné informace z literatury naznačují, že některé metabolity mohou dosáhnout dostatečných koncentrací v plasmě a navíc se jedná o metabolity tvořené z více flavonoidních, nebo dokonce i obecně polyfenolických, prekurzorů než jen z kvercetinu. Např. 4-methylkatecholsulfát se dá detekovat v plazmě právě asi v důsledku jeho produkce v tlustém střevě z různých polyfenolů (Pimpao *et al.* 2015), navíc v jedné studii dosáhl tento metabolit po podání jedné dávky brusinkového džusu (450 ml) 3.5 μM (Feliciano *et al.* 2016). To je více než dosažitelné plasmatické koncentrace u většiny flavonoidů – medián je podle recentní studie u flavonoidů

0.1 μM (Feliciano *et al.* 2016; Rothwell *et al.* 2016). Kinetika 3-HPPA je málo prozkoumaná, ale je známo, že se tvoří také např. při příjmu flavanolů epikatechinu a katechinu a jejich oligo- a polymerních forem (proanthocyanidinů) a flavonu diosminu (Bazzocco *et al.* 2008; Cova *et al.* 1992; Das a Griffiths 1969). Zejména jeho tvorba lidskou mikroflorou z epicatechinu nabízí asociace, zda nemůže být jednou z komponent zodpovědných za snížení krevního tlaku po vysokém příjmu kakaa dobře dokumentovaném u izolované populace panamských Indiánů kmene Kuna (Rechner *et al.* 2002; Rios *et al.* 2003). Navíc se může vyskytovat hlavně ve volné formě, jeho konjugát s glukuronovou kyselinou nebyl nalezen (Rechner *et al.* 2002). 3,4-DHAA se také tvoří z flavanolů kakaa (Rios *et al.* 2003). Jeho významnost jako metabolitu flavonoidů a/nebo jiných fenolických látek dokládá i studie po podání rozmačkaných malin dobrovolníkům, kde jeho koncentrace ve stolici dosáhla 400 μM (Rechner *et al.* 2002).

I z tohoto důvodu jsme se rozhodli otestovat vliv dalších známých flavonoidních metabolitů tvořených lidskou mikroflorou. Výsledky byly ale zklamáním a žádný z těchto metabolitů nedosáhl ani zdaleka účinnosti 3-HPPA, 3,4-DHPA, 4-methylcatecholu nebo kvercetinu. Zajímavým nálezem bylo dokonce mírné vazokonstrikční působení pyrogallolu, generátoru superoxidových radikálů (Tosaka *et al.* 2002).

Dlouhodobě jsme se zajímali o možnost prověřit účinky kvercetinu v *in vivo* podmínkách. Hlavní překážkou byla jeho zanedbatelná rozpustnost ve vodě. Ve spolupráci s doc. Elisabettou Gavini z Univerzity v Sassari jsme získali preparát, který díky přítomnosti jednoho (z důvodu utajení zatím nespecifikovaného) polymeru, umožnil přípravu kvercetinu s dobrou rozpustností ve fyziologickém roztoku a tedy i i.v. aplikaci v dostatečné dávce. Tím jsme jako první mohli vyzkoušet i.v. podání kvercetinu bez použití DMSO nebo jiných organických rozpouštědel. Nejprve jsme tento nový preparát zkoušeli aplikovat jako bolusové

dávky. Mezi jednotlivými pokusy byla významná variabilita, arteriální krevní tlak sice poklesl, ale k tomu došlo u jednotlivých zvířat po podání různých dávek a v různé míře.

V poslední studii jsme vyzkoušeli dlouhodobý účinek bolusového podání tohoto preparátu na arteriální tlak krve, který byl měřen neinvazivně tlakovou manžetou na ocase potkana. Za první půlhodinu nedošlo k žádnému poklesu tlaku krve, asi z důvodu stresové reakce na i.v. aplikaci do ocasní žíly. Tlak začal klesat až po půlhodině od aplikace, signifikantního poklesu oproti kontrolnímu podání polymeru bylo dosaženo mezi třetí a pátou hodinou a následovalo pozvolná normalizace krevního tlaku až do 24. hodiny.

6. Závěr a výhled do budoucna

Tato disertační práce shrnuje poznatky o vasorelaxačních účincích kvercetinu a jeho metabolitů. Ačkoli metabolity prvního řádu, tzn. methylderiváty a konjugáty kvercetinu s glukuronidem a sulfátem již byly testovány na vasorelaxační aktivitu, přinesl náš výzkum zcela nové poznatky o vasorelaxačních účincích dalších metabolitů tvořených v tlustém střevě pomocí enzymů bakteriální mikroflóry.

Nejúčinnějšími metabolity kvercetinu byly identifikovány kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, 3,4-dihydroxyfenyloctová a 4-methylcatechol. Jejich vasorelaxační účinky byly potvrzeny jak v *in vitro*, tak i *in vivo* podmínkách.

Součástí této práce bylo také *in vivo* testování jednoho z *in vitro* neúčinných metabolitů, a to kvercetin-3-O-glukuronidu, který při bolusovém podání v *in vivo* pokusech nedokázal signifikantně snížit krevní tlak. Bylo nám také umožněno testovat vasorelaxační vlastnosti speciálně upraveného kvercetinu, který po bolusovém podání dokázal dlouhodobě snižovat tlak krve.

Přestože tato studie přinesla celou řadu výsledků, neumožnila definitivně odpovědět na některé otázky a přinesla tedy i další náměty ke studiu. Kromě zmíněné farmakokinetické analýzy nejúčinnějších metabolitů a prověření kombinace těchto účinných metabolitů plánujeme pokračovat v dalších experimentech, zejména ve spolupráci s našimi kolegy z analytické chemie a Univerzity v Sassari.

Mezi plánované pokusy patří:

- a) kombinace metabolitů flavonoidů s klinicky používanými antihypertensivy,
- b) zjištění klinicky dosažitelných koncentrací flavonoidních metabolitů v lidské krvi,
- c) otestování podání jiných flavonoidů i.v.,
- d) porovnání vlivu konjugátů flavonoidů a fenolických kyselin s parentními látkami.

7. Seznam zkratek

3,4-DHCA – 3,4-dihydroxyhydroskořicová kyselina (z angl. 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid)

3,4-DHPA – 3,4-dihydroxyfenyloctová kyselina (z angl. 3,4-dihydroxyphenylacetic acid)

3-HPA – 3-hydroxypropionová kyselina

3-HPPA – 3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina (z angl. 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid)

ATP – adenosintrifosfát

DMSO - dimethylsulfoxid

$dpdt_{max}$ - maximální rychlost vzestupu tlaku v levé komoře

$dpdt_{min}$ - minimální rychlost vzestupu tlaku v levé komoře

eNOS – endotelová NO syntáza

GB - Goldblatt hypertenzní potkan

L-NAME - N^G-nitro-L-arginine methyl ester

L-NNA - N^o-nitro-L-arginin

NA – noradrenalin

p_{max} - maximální tlak v levé komoře

RONS – reaktivní formy kyslíku a dusíku (z angl. reactive oxygen and nitrogen species)

SHR – spontánně hypertenzní potkan

U46619 – analog tromboxanu A₂

V_{end} - objem krve v levé komoře na konci diastoly

8. Přehled odborných publikací

8.1 Recenzované publikace v odborných časopisech

s impaktním faktorem

1. NAJMANOVÁ, I., DOSEDĚL, M., HRDINA, R., ANZENBACHER, P., FILIPSKÝ, T., ŘÍHA, M. a MLADĚNKA, P. Cardiovascular Effects of Coumarins Besides their Antioxidant Activity. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(9):830-49 /IF₂₀₁₃=3.5/

Procentuální podíl na sepsání revizního článku - 40% - shromáždění dostupné literatury, sepsání vasorelaxačních účinků kumarinů, vytvoření tabulek a obrázků, závěrečné korekce.

2. NAJMANOVÁ, I., POUROVÁ, J., VOPRŠALOVÁ, M., PILAŘOVÁ, V., SEMECKÝ, V., NOVÁKOVÁ, L. a MLADĚNKA, P. The flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat. *Mol Nut Food Chem* 2016;60(5):981-91 /IF₂₀₁₄=4.6/

Procentuální podíl na sepsání tohoto článku - 40% - prováděla jsem in vitro screening metabolitů kvercetinu, testovala vasorelaxační účinky na renální arterii a zjišťovala mechanismus účinku. Prováděla jsem in vivo měření na Wistar:Han i SHR potkanech. Sepsala jsem materiální a metodickou část a také výsledky. Připravila jsem jednotlivé obrázky a grafy. Podílela jsem se na závěrečné korekci.

8.2 Prezentace na konferencích

1. Society for Free Radical Research – Europe Meeting Paris 2014

Paříž, Francie, 5.-7. 9. 2014

NAJMANOVÁ, I., VOPRŠÁLOVÁ, M., MLADĚNKA, P. Vasodilatory activity of human quercetin metabolites. *Sborník abstraktů z konference P63.*

2. 5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické

fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze

Hradec Králové, 3.-4. 2. 2015

NAJMANOVÁ, I., VOPRŠÁLOVÁ, M., MLADĚNKA, P. Vasodilatory effects of quercetin and its metabolites on vascular smooth muscle in healthy and spontaneously hypertensive rats. *Sborník abstraktů z konference str. 71*

3. New Frontiers in Basic Cardiovascular Research - A France-New EU Members

Châtenay-Malabry – Francie, 3-6 July 2016

NAJMANOVÁ, I., POUROVÁ, J., VOPRŠÁLOVÁ, M., MLADĚNKA, P. The effect of quercetin and its metabolites on vascular smooth muscle. *Sborník abstraktů z konference P9.*

9. Reference

- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., and Takada, Y. 2004. 'Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies', *Anticancer Res*, 24: 2783-840.
- Ajay, M., Gilani, A. U., and Mustafa, M. R. 2003. 'Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta', *Life Sci*, 74: 603-12.
- Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M., and Ullah, M. O. 2016. 'Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity', *Nutr Metab (Lond)*, 13: 27.
- Arts, I. C., and Hollman, P. C. 2005. 'Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies', *Am J Clin Nutr*, 81: 317S-25S.
- Bakhit, R. M., Klein, B. P., Essex-Sorlie, D., Ham, J. O., Erdman, J. W., Jr., and Potter, S. M. 1994. 'Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations', *J Nutr*, 124: 213-22.
- Bazzocco, S., Mattila, I., Guyot, S., Renard, C. M., and Aura, A. M. 2008. 'Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro', *Eur J Nutr*, 47: 442-52.
- Bezstarosti, K., Das, S., Lamers, J. M., and Das, D. K. 2006. 'Differential proteomic profiling to study the mechanism of cardiac pharmacological preconditioning by resveratrol', *J Cell Mol Med*, 10: 896-907.
- Bnouham, M., Benalla, W., Bellahcen, S., Hakkou, Z., Ziyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M., and Legssyer, A. 2012. 'Antidiabetic and antihypertensive effect of a polyphenol-rich

- fraction of *Thymelaea hirsuta* L. in a model of neonatal streptozotocin-diabetic and N(G) -nitro-l-arginine methyl ester-hypertensive rats', *J Diabetes*, 4: 307-13.
- Braune, A., Gutschow, M., Engst, W., and Blaut, M. 2001. 'Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*', *Appl Environ Microbiol*, 67: 5558-67.
- Bravo, L. 1998. 'Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance', *Nutr Rev*, 56: 317-33.
- Brossaud, F., Cheynier, V. and Noble, A. C. 2001. 'Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols.', *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7: 33-39.
- Calabriso, N., Scoditti, E., Massaro, M., Pellegrino, M., Storelli, C., Ingrosso, I., Giovinazzo, G., and Carluccio, M. A. 2016. 'Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression', *Eur J Nutr*, 55: 477-89.
- Cao, Y. X., Yang, X. J., Liu, J., and Li, K. X. 2006. 'Effects of daidzein sulfates on blood pressure and artery of rats', *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 99: 425-30.
- Carbonaro, M., and Grant, G. 2005. 'Absorption of quercetin and rutin in rat small intestine', *Ann Nutr Metab*, 49: 178-82.
- Cassidy, A., O'Reilly, E. J., Kay, C., Sampson, L., Franz, M., Forman, J. P., Curhan, G., and Rimm, E. B. 2011. 'Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults', *Am J Clin Nutr*, 93: 338-47.
- Cova, D., De Angelis, L., Giavarini, F., Palladini, G., and Perego, R. 1992. 'Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers', *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*, 30: 29-33.

- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., and Remesy, C. 2002. 'Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach', *J Agric Food Chem*, 50: 618-21.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., and Remesy, C. 1999. 'Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen', *Am J Physiol*, 277: G120-6.
- Crouse, J. R., 3rd, Morgan, T., Terry, J. G., Ellis, J., Vitolins, M., and Burke, G. L. 1999. 'A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins', *Arch Intern Med*, 159: 2070-6.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., and Masella, R. 2007. 'Polyphenols, dietary sources and bioavailability', *Ann Ist Super Sanita*, 43: 348-61.
- Dai, J., and Mumper, R. J. 2010. 'Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties', *Molecules*, 15: 7313-52.
- Dar, A. A., and Arumugam, N. 2013. 'Lignans of sesame: purification methods, biological activities and biosynthesis--a review', *Bioorg Chem*, 50: 1-10.
- Das, N. P., and Griffiths, L. A. 1969. 'Studies on flavonoid metabolism. Metabolism of (+)-[14C] catechin in the rat and guinea pig', *Biochem J*, 115: 831-6.
- Das, S., Fraga, C. G., and Das, D. K. 2006. 'Cardioprotective effect of resveratrol via HO-1 expression involves p38 map kinase and PI-3-kinase signaling, but does not involve NFkappaB', *Free Radic Res*, 40: 1066-75.
- Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., McLauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R., and Williamson, G. 2000. 'Dietary flavonoid and isoflavone glycosides

are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase', *FEBS Lett*, 468: 166-70.

- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., and Williamson, G. 1998. 'Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity', *FEBS Lett*, 436: 71-5.
- Dong, X., Liu, T., Yan, J., Wu, P., Chen, J., and Hu, Y. 2009. 'Synthesis, biological evaluation and quantitative structure-activities relationship of flavonoids as vasorelaxant agents', *Bioorg Med Chem*, 17: 716-26.
- Duarte, J., Jimenez, R., Villar, I. C., Perez-Vizcaino, F., Jimenez, J., and Tamargo, J. 2001a. 'Vasorelaxant effects of the bioflavonoid chrysin in isolated rat aorta', *Planta Med*, 67: 567-9.
- Duarte, J., Perez-Palencia, R., Vargas, F., Ocete, M. A., Perez-Vizcaino, F., Zarzuelo, A., and Tamargo, J. 2001b. 'Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats', *Br J Pharmacol*, 133: 117-24.
- Duarte, J., Perez Vizcaino, F., Utrilla, P., Jimenez, J., Tamargo, J., and Zarzuelo, A. 1993. 'Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships', *Gen Pharmacol*, 24: 857-62.
- Feliciano, R. P., Boeres, A., Massacessi, L., Ista, G., Ventura, M. R., Nunes Dos Santos, C., Heiss, C., and Rodriguez-Mateos, A. 2016. 'Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols', *Arch Biochem Biophys*, 599: 31-41.

- Filipsky, T., Riha, M., Macakova, K., Anzenbacherova, E., Karlickova, J., and Mladenka, P. 2015. 'Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes', *Curr Top Med Chem*, 15: 415-31.
- Filipsky, T., Zatloukalova, L., Mladenka, P., and Hrdina, R. 2012. 'Acute initial haemodynamic changes in a rat isoprenaline model of cardiotoxicity', *Hum Exp Toxicol*, 31: 830-43.
- Firuzi, O., Mladenka, P., Petrucci, R., Marrosu, G., and Saso, L. 2004. 'Hypochlorite scavenging activity of flavonoids', *J Pharm Pharmacol*, 56: 801-7.
- Galindo, P., Gonzalez-Manzano, S., Zarzuelo, M. J., Gomez-Guzman, M., Quintela, A. M., Gonzalez-Paramas, A., Santos-Buelga, C., Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., and Jimenez, R. 2012a. 'Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats', *Food Funct*, 3: 643-50.
- Galindo, P., Rodriguez-Gomez, I., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., Jimenez, R., Menendez, C., Vargas, F., Tamargo, J., Santos-Buelga, C., Perez-Vizcaino, F., and Duarte, J. 2012b. 'Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation', *PLoS One*, 7: e32673.
- Garcia-Saura, M. F., Galisteo, M., Villar, I. C., Bermejo, A., Zarzuelo, A., Vargas, F., and Duarte, J. 2005. 'Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension', *Mol Cell Biochem*, 270: 147-55.
- Graefe, E. U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A. K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., and Veit, M. 2001. 'Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans', *J Clin Pharmacol*, 41: 492-9.
- Grassi, D., Desideri, G., Croce, G., Tiberti, S., Aggio, A., and Ferri, C. 2009. 'Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection', *Curr Pharm Des*, 15: 1072-84.

- Griffiths, L. A., and Barrow, A. 1972. 'Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats', *Biochem J*, 130: 1161-2.
- Grosso, G., Stepaniak, U., Topor-Madry, R., Szafraniec, K., and Pajak, A. 2014. 'Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in the Polish arm of the HAPIEE study', *Nutrition*, 30: 1398-403.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. 2002. 'Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships', *J Nutr Biochem*, 13: 572-84.
- Herrera, M. D., Zarzuelo, A., Jimenez, J., Marhuenda, E., and Duarte, J. 1996. 'Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships', *Gen Pharmacol*, 27: 273-7.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. 1993a. 'Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study', *Lancet*, 342: 1007-11.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. 1994. 'Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study', *Nutr Cancer*, 22: 175-84.
- Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B., and Kromhout, D. 1993b. 'Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands', *Nutr Cancer*, 20: 21-9.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., and Katan, M. B. 1992. 'Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands', *Journal of agricultural and food chemistry*, 40: 2379-83.

- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., and Van de Putte, B. 1993c. 'Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices', *Journal of agricultural and food chemistry*, 41: 1242-46.
- Hertog, M. G., Sweetnam, P. M., Fehily, A. M., Elwood, P. C., and Kromhout, D. 1997. 'Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study', *Am J Clin Nutr*, 65: 1489-94.
- Hollman, P. C., Bijlsma, M. N., van Gameren, Y., Crossen, E. P., de Vries, J. H., and Katan, M. B. 1999. 'The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man', *Free Radic Res*, 31: 569-73.
- Hollman, P. C. H., and Arts, I. C. W. 2000. 'Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1081-93.
- Hollman, P. C., and Katan, M. B. 1997. 'Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man', *Biomed Pharmacother*, 51: 305-10.
- Hurst, W. J., Krake, S. H., Bergmeier, S. C., Payne, M. J., Miller, K. B., and Stuart, D. A. 2011. 'Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients', *Chem Cent J*, 5: 53.
- Chan, E. C., Pannangpetch, P., and Woodman, O. L. 2000. 'Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships', *J Cardiovasc Pharmacol*, 35: 326-33.
- Chen, C. K., and Pace-Asciak, C. R. 1996. 'Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta', *Gen Pharmacol*, 27: 363-6.

- Chun, O. K., Chung, S. J., and Song, W. O. 2007. 'Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults', *J Nutr*, 137: 1244-52.
- Ibarra, M., Moreno, L., Vera, R., Cogolludo, A., Duarte, J., Tamargo, J., and Perez-Vizcaino, F. 2003. 'Effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolite isorhamnetin in isolated arteries from spontaneously hypertensive rats', *Planta Med*, 69: 995-1000.
- Ibarra, M., Perez-Vizcaino, F., Cogolludo, A., Duarte, J., Zaragoza-Arnaez, F., Lopez-Lopez, J. G., and Tamargo, J. 2002. 'Cardiovascular effects of isorhamnetin and quercetin in isolated rat and porcine vascular smooth muscle and isolated rat atria', *Planta Med*, 68: 307-10.
- Jaganath, I. B., Mullen, W., Lean, M. E., Edwards, C. A., and Crozier, A. 2009. 'In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites', *Free Radic Biol Med*, 47: 1180-9.
- Justesen, U., Knuthsen, P., Andersen, N. L., and Leth, T. 2000. 'Estimation of daily intake distribution of flavonols and flavanones in Denmark', *Scandinavian Journal of Nutrition/Naringsforskning*, 44: 158-60.
- Kass, D. A., Maughan, W. L., Guo, Z. M., Kono, A., Sunagawa, K., and Sagawa, K. 1987. 'Comparative influence of load versus inotropic states on indexes of ventricular contractility: experimental and theoretical analysis based on pressure-volume relationships', *Circulation*, 76: 1422-36.
- Khoo, N. K., White, C. R., Pozzo-Miller, L., Zhou, F., Constance, C., Inoue, T., Patel, R. P., and Parks, D. A. 2010. 'Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels', *Free Radic Biol Med*, 49: 339-47.

- Kim, D. H., Jung, E. A., Sohng, I. S., Han, J. A., Kim, T. H., and Han, M. J. 1998. 'Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities', *Arch Pharm Res*, 21: 17-23.
- King, A., and Young, G. 1999. 'Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals', *J Am Diet Assoc*, 99: 213-8.
- Koes, R. E., Quattrocchio F. and Mol, J. N. M. 1994. 'The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution', *BioEssays*, 16: 123-32.
- Komorsky-Lovric, S.; Novak, I. 2011. 'Determination of Ellagic Acid in Strawberries, Raspberries and Blackberries by Square-Wave Voltammetry', *International Journal of Electrometry*, 6: 4638-47.
- Konate, K., Hilou, A., Mavoungou, J. F., Lepengue, A. N., Souza, A., Barro, N., Datte, J. Y., M'Batchi, B., and Nacoulma, O. G. 2012. 'Antimicrobial activity of polyphenol-rich fractions from *Sida alba* L. (Malvaceae) against co-trimoxazol-resistant bacteria strains', *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 11: 5.
- Kushwaha, P., Khedgikar, V., Ahmad, N., Karvande, A., Gautam, J., Kumar, P., Maurya, R., and Trivedi, R. 2016. 'A neoflavonoid dalsissoal isolated from heartwood of *Dalbergia sissoo* Roxb. has bone forming effects in mice model for osteoporosis', *Eur J Pharmacol*, 788: 65-74.
- Lampe, J. W., Atkinson, C., and Hullar, M. A. 2006. 'Assessing exposure to lignans and their metabolites in humans', *J AOAC Int*, 89: 1174-81.
- Lee, D. S., Kim, K. S., Ko, W., Li, B., Keo, S., Jeong, G. S., Oh, H., and Kim, Y. C. 2014. 'The neoflavonoid latifolin isolated from MeOH extract of *Dalbergia odorifera* attenuates

- inflammatory responses by inhibiting NF-kappaB activation via Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression', *Phytother Res*, 28: 1216-23.
- Li, P. G., Sun, L., Han, X., Ling, S., Gan, W. T., and Xu, J. W. 2012. 'Quercetin induces rapid eNOS phosphorylation and vasodilation by an Akt-independent and PKA-dependent mechanism', *Pharmacology*, 89: 220-8.
- Lodi, F., Jimenez, R., Moreno, L., Kroon, P. A., Needs, P. W., Hughes, D. A., Santos-Buelga, C., Gonzalez-Paramas, A., Cogolludo, A., Lopez-Sepulveda, R., Duarte, J., and Perez-Vizcaino, F. 2009. 'Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta', *Atherosclerosis*, 204: 34-9.
- Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., McKinley, A. J., Puddey, I. B., and Croft, K. D. 2008. 'Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men', *Am J Clin Nutr*, 88: 1018-25.
- Machha, A., and Mustafa, M. R. 2005. 'Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta', *J Cardiovasc Pharmacol*, 46: 36-40.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F., and Remesy, C. 1998. 'Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties', *FEBS Lett*, 426: 331-6.
- Manach, C., Morand, C., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F., and Remesy, C. 1997. 'Bioavailability of rutin and quercetin in rats', *FEBS Lett*, 409: 12-6.

- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L. 2004. 'Polyphenols: food sources and bioavailability', *Am J Clin Nutr*, 79: 727-47.
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., and Holub, B. J. 2002. 'Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects', *J Agric Food Chem*, 50: 7731-7.
- Menendez, C., Duenas, M., Galindo, P., Gonzalez-Manzano, S., Jimenez, R., Moreno, L., Zarzuelo, M. J., Rodriguez-Gomez, I., Duarte, J., Santos-Buelga, C., and Perez-Vizcaino, F. 2011. 'Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed?', *Mol Nutr Food Res*, 55: 1780-90.
- Mink, P. J., Scrafford, C. G., Barraj, L. M., Harnack, L., Hong, C. P., Nettleton, J. A., and Jacobs, D. R., Jr. 2007. 'Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women', *Am J Clin Nutr*, 85: 895-909.
- Mladenka, P., Macakova, K., Filipicky, T., Zatloukalova, L., Jahodar, L., Bovicelli, P., Silvestri, I. P., Hrdina, R., and Saso, L. 2011. 'In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids', *J Inorg Biochem*, 105: 693-701.
- Mladenka, P., Zatloukalova, L., Filipicky, T., and Hrdina, R. 2010. 'Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity', *Free Radic Biol Med*, 49: 963-75.
- Morand, C., Manach, C., Crespy, V., and Remesy, C. 2000. 'Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma', *Free Radic Res*, 33: 667-76.
- Muir, R. M., Ibanez, A. M., Uratsu, S. L., Ingham, E. S., Leslie, C. A., McGranahan, G. H., Batra, N., Goyal, S., Joseph, J., Jemmis, E. D., and Dandekar, A. M. 2011. 'Mechanism of

- gallic acid biosynthesis in bacteria (*Escherichia coli*) and walnut (*Juglans regia*)', *Plant Mol Biol*, 75: 555-65.
- Murota, K., Shimizu, S., Chujo, H., Moon, J. H., and Terao, J. 2000. 'Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2', *Arch Biochem Biophys*, 384: 391-7.
- Murota, K., and Terao, J. 2003. 'Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism', *Arch Biochem Biophys*, 417: 12-7.
- Nagy, M., Grančai, D., and Mučaji, P. 2011. *Farmakognózia : Biogenéza prírodných látok*: 133.
- Najmanova, I., Dosedel, M., Hrdina, R., Anzenbacher, P., Filipicky, T., Riha, M., and Mladenka, P. 2015. 'Cardiovascular effects of coumarins besides their antioxidant activity', *Curr Top Med Chem*, 15: 830-49.
- Najmanova, I., Pourova, J., Voprsalova, M., Pilarova, V., Semecky, V., Novakova, L., and Mladenka, P. 2016. 'Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats', *Mol Nutr Food Res*, 60: 981-91.
- Ngamukote, S., Makynen, K., Thilawech, T., and Adisakwattana, S. 2011. 'Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed', *Molecules*, 16: 5054-61.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M., and Katan, M. B. 2003. 'Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans', *J Nutr*, 133: 1806-14.
- Pandey, K. B., and Rizvi, S. I. 2009. 'Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease', *Oxid Med Cell Longev*, 2: 270-8.

- Peng, X., Zhang, Z., Zhang, N., Liu, L., Li, S., and Wei, H. 2014. 'In vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites', *Food Nutr Res*, 58.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Jimenez, R., Santos-Buelga, C., and Osuna, A. 2009. 'Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin', *Pharmacol Rep*, 61: 67-75.
- Perez-Vizcaino, F., Ibarra, M., Cogolludo, A. L., Duarte, J., Zaragoza-Arnez, F., Moreno, L., Lopez-Lopez, G., and Tamargo, J. 2002. 'Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries', *J Pharmacol Exp Ther*, 302: 66-72.
- Perez, A., Gonzalez-Manzano, S., Jimenez, R., Perez-Abud, R., Haro, J. M., Osuna, A., Santos-Buelga, C., Duarte, J., and Perez-Vizcaino, F. 2014. 'The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity', *Pharmacol Res*, 89: 11-8.
- Pimpao, R. C., Ventura, M. R., Ferreira, R. B., Williamson, G., and Santos, C. N. 2015. 'Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit puree', *Br J Nutr*, 113: 454-63.
- Pipe, E. A., Gobert, C. P., Capes, S. E., Darlington, G. A., Lampe, J. W., and Duncan, A. M. 2009. 'Soy protein reduces serum LDL cholesterol and the LDL cholesterol:HDL cholesterol and apolipoprotein B:apolipoprotein A-I ratios in adults with type 2 diabetes', *J Nutr*, 139: 1700-6.
- Rechner, A. R., Kuhnle, G., Hu, H., Roedig-Penman, A., van den Braak, M. H., Moore, K. P., and Rice-Evans, C. A. 2002. 'The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites', *Free Radic Res*, 36: 1229-41.

- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K., Moore, K. P., and Rice-Evans, C. A. 2004. 'Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products', *Free Radic Biol Med*, 36: 212-25.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. 1996. 'Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids', *Free Radic Biol Med*, 20: 933-56.
- Rios, L. Y., Gonthier, M. P., Remesy, C., Mila, I., Lapierre, C., Lazarus, S. A., Williamson, G., and Scalbert, A. 2003. 'Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects', *Am J Clin Nutr*, 77: 912-8.
- Rothwell, J. A., Urpi-Sarda, M., Boto-Ordóñez, M., Llorach, R., Farran-Codina, A., Barupal, D. K., Neveu, V., Manach, C., Andres-Lacueva, C., and Scalbert, A. 2016. 'Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database', *Mol Nutr Food Res*, 60: 203-11.
- Sagara, M., Kanda, T., M, N. Jelekera, Teramoto, T., Armitage, L., Birt, N., Birt, C., and Yamori, Y. 2004. 'Effects of dietary intake of soy protein and isoflavones on cardiovascular disease risk factors in high risk, middle-aged men in Scotland', *J Am Coll Nutr*, 23: 85-91.
- Sawai, Y., Kohsaka, K., Nishiyama, Y., and Ando, K. 1987. 'Serum concentrations of rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans', *Arzneimittelforschung*, 37: 729-32.
- Serra, A., Macià, A., Romero, M.-P., Reguant, J., Ortega, N., and Motilva, M.-J. 2012. 'Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids.', *Food Chemistry*, 130: 383-93.

- Sesso, H. D., Gaziano, J. M., Liu, S., and Buring, J. E. 2003. 'Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women', *Am J Clin Nutr*, 77: 1400-8.
- Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M. D., and Blaut, M. 1999. 'Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract', *Arch Microbiol*, 171: 81-91.
- Tan, A. C., Konczak, I., Sze, D. M., and Ramzan, I. 2011. 'Molecular pathways for cancer chemoprevention by dietary phytochemicals', *Nutr Cancer*, 63: 495-505.
- Tosaka, M., Hashiba, Y., Saito, N., Imai, H., Shimizu, T., and Sasaki, T. 2002. 'Contractile responses to reactive oxygen species in the canine basilar artery in vitro: selective inhibitory effect of MCI-186, a new hydroxyl radical scavenger', *Acta Neurochir (Wien)*, 144: 1305-10; discussion 10.
- Tsao, R. 2010. 'Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols', *Nutrients*, 2: 1231-46.
- van Acker, S. A., de Groot, M. J., van den Berg, D. J., Tromp, M. N., Donne-Op den Kelder, G., van der Vijgh, W. J., and Bast, A. 1996. 'A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids', *Chem Res Toxicol*, 9: 1305-12.
- Walgren, R. A., Lin, J. T., Kinne, R. K., and Walle, T. 2000. 'Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1', *J Pharmacol Exp Ther*, 294: 837-43.
- Wangen, K. E., Duncan, A. M., Xu, X., and Kurzer, M. S. 2001. 'Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolemic postmenopausal women', *Am J Clin Nutr*, 73: 225-31.
- Webb, R. C. 2003. 'Smooth muscle contraction and relaxation', *Adv Physiol Educ*, 27: 201-6.

- Weiss, J. L., Frederiksen, J. W., and Weisfeldt, M. L. 1976. 'Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure', *J Clin Invest*, 58: 751-60.
- Williamson, G., and Clifford, M. N. 2010. 'Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?', *Br J Nutr*, 104 Suppl 3: S48-66.
- Woodman, O. L., Meeker, W. F., and Boujaoude, M. 2005. 'Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones: structure-activity relationships', *J Cardiovasc Pharmacol*, 46: 302-9.
- Xu, Y. C., Leung, S. W., Yeung, D. K., Hu, L. H., Chen, G. H., Che, C. M., and Man, R. Y. 2007. 'Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery', *Phytochemistry*, 68: 1179-88.
- Zhang, Y., Li, Y., Cao, C., Cao, J., Chen, W., Zhang, Y., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., and Zhao, X. 2010. 'Dietary flavonol and flavone intakes and their major food sources in Chinese adults', *Nutr Cancer*, 62: 1120-7.

Přímý odkaz na webové stránky firmy Millar: www.millar.com

<http://millar.com/products/research/pressure-volume/pressure-volume-catheters/spr-838>

http://millar.com/mpvs_training_cd/FlashHelp/operation/volume_cuvette_calibration.htm

– stránky naposledy navštíveny 6.2.2017

10. Soubor publikací

NAJMANOVÁ, I., DOSEDĚL, M., HRDINA, R., ANZENBACHER, P., FILIPSKÝ, T., ŘÍHA, M. a MLADĚNKA, P. Cardiovascular Effects of Coumarins Besides their Antioxidant Activity. *Curr Top Med Chem.* 2015;15(9):830-49 Str. 131- 150

NAJMANOVÁ, I., POUROVÁ, J., VOPRŠALOVÁ, M., PILAŘOVÁ, V., SEMECKÝ, V., NOVÁKOVÁ, L. a MLADĚNKA, P. The flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat. *Mol Nut Food Chem* 2016;60(5):981-91 Str. 151 - 172

Cardiovascular Effects of Coumarins Besides their Antioxidant Activity

Iveta Najmanová^{1a}, Martin Doseděl^{1b}, Radomír Hrdina^{1a}, Pavel Anzenbacher², Tomáš Filipický^{1a}, Michal Říha^{1a} and Přemysl Mladěnka^{1a,*}

¹Charles University in Prague; Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Czech Republic; ^aDepartment of Pharmacology and Toxicology and ^bDepartment of Social and Clinical Pharmacy; ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic



Přemysl Mladěnka

Abstract: Coumarins are a large group of substances, primarily of plant origin. Like their more intensively examined congeners flavonoids, many of them are antioxidants. Although such properties may be advantageous in cardiovascular diseases, it has been shown that coumarins exhibit direct effects on the cardiovascular system which are not based on antioxidant activity. The most common example is the well-known drug warfarin, a synthetic compound derived from natural dicoumarol. Moreover, other coumarins have been shown to possess antiplatelet and vasodilatory potential. Interestingly, the former effect may be mediated by the inhibition of various pathways leading to platelet aggregation, their differing effects on those pathways being due to structural differences between the various coumarins. Conversely, their vasodilatory potential is linked in the majority of cases to the inhibition of increases in intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells, and in several coumarins also to NO-mediated vasodilatation. Available data on both activities are summarized in this review. At the end of this review, relevant data are provided from a few studies testing the *in vivo* effects of coumarins on major cardiovascular diseases; the clinical use of warfarin and other coumarin anticoagulants, as well as the limited data on the clinical use of coumarins in chronic venous insufficiency and the possible toxicological effects of coumarins.

Keywords: antioxidant, antiplatelet, cardiovascular, coumarin, vasodilation, warfarin.

INTRODUCTION

Coumarins (also known as 2*H*-1-benzopyran-2-ones or less commonly as *o*-hydroxycinnamic acid-8-lactones) are a large class of compounds with more than 1300 members broadly distributed as secondary metabolites in the plant kingdom, and in addition, their presence has also been detected in fungi, bacteria and animals. In plants, coumarins occur both as free compounds and glycosides, and, moreover, many other coumarins have been synthesized [1-4]. The name is derived from *Coumarouna odorata Aube* (*Dipterix odorata*), a plant from which the prototypical compound coumarin was isolated in 1820 [2]. Based on an epidemiological survey study, the average dietary coumarin intake for a 60-kg consumer has been estimated to be 0.02 mg/kg/day. From fragrance use in cosmetic products, coumarin exposure has been estimated to be 0.04 mg/kg/day [4].

According to their chemical structure, coumarins can be divided into several chemical subgroups including simple coumarins, isocoumarins, furanocoumarins, pyranocoumarins, biscoumarins, triscoumarins and coumarinolignans (Fig. 1) [2, 5]. Although a vast number of coumarins have been isolated or synthesized, only a few substances have been largely characterized in terms of their pharmacological or

*Address correspondence to this author at the Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacology and Toxicology, Heyrovského 1 203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic; Tel: +420 495 067 295; Fax: +420 495 067 170; E-mail: mladenkap@faf.cuni.cz

toxicological properties in human. These compounds include warfarin and related anticoagulants, aflatoxins and psoralens [3]. Aflatoxins, fungal metabolites from *Aspergillus* spp., are potent hepatotoxins, cancerogens and can contaminate food [3, 6]. Psoralens are photosensitizing agents and certain substances can be used in the treatment of inflammatory skin disorders, such as psoriasis [3].

Many recent studies have documented the potentially positive effect of coumarins in a variety of pathologic conditions. These possible effects include antibacterial [7], anti-inflammatory [8], anticancer [9], antiviral [10], antioxidant [11], the above-mentioned anticoagulant activities and other positive cardiovascular effects, which will be discussed in this review. On the other hand, pro-carcinogenic activity and hepatotoxicity were also observed [12, 13]. Positive cardiovascular effects were found in several studies and may be partly based on antioxidant activity. As the chemical nature of coumarins is similar to flavonoids, these effects were expected and documented in many studies. Their antioxidant activity is based both on the direct scavenging of reactive oxygen and nitrogen species and on transient metal chelation and as well on the inhibition of free-radical-forming enzymes such as xanthine oxidase [14-17]. Because an analysis of the structure-antioxidant activity relationship is the topic of another study in this issue, this review is focused on the detailed analysis of the known cardiovascular effects of coumarins, which are not based on antioxidant activity, but on direct interaction with the cardiovascular system. The most data are available on the vasorelaxant and antiplatelet effect of coumarins. A short clinical overview of

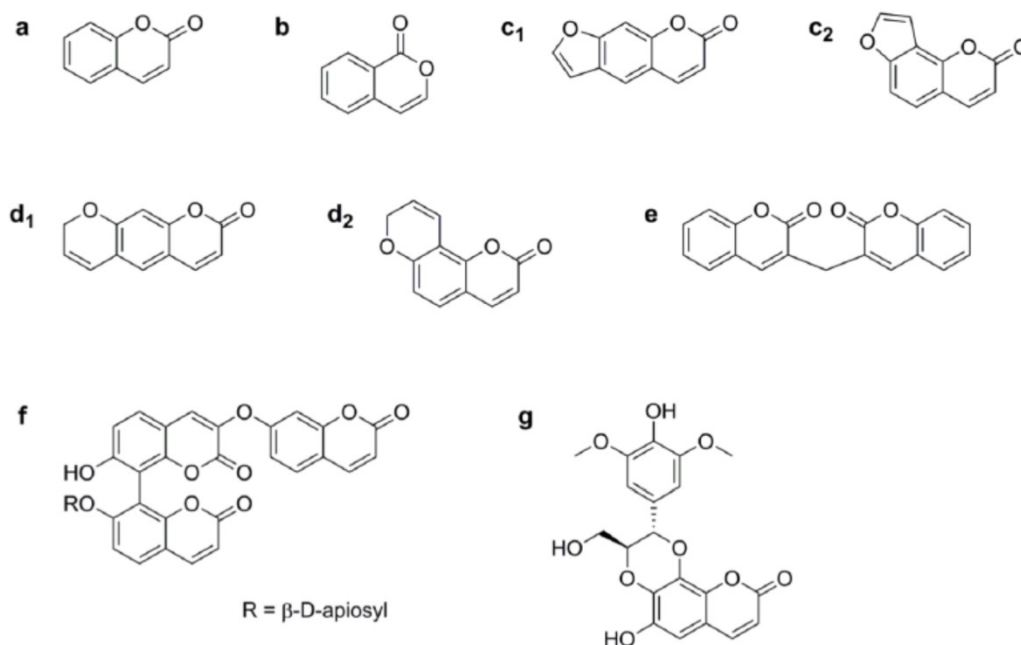


Fig. (1). Basic coumarin types (a-d) and examples of other rare coumarins (e-g): (a) simple coumarin, (b) isocoumarin, (c) furanocoumarin, (d) pyranocoumarin, (e) an example of biscoumarin (dicoumarol), (f) an example of triscoumarins (Edgeworoside B) and (g) an example of coumarinolignans (daphnecin). Both furanocoumarins and pyranocoumarins can be further briefly divided into linear (c1, d1) and angular (c2, d2) forms.

anticoagulant coumarins is presented at the end, as well as the limited data on the use of coumarins in chronic venous insufficiency.

VASORELAXANT PROPERTIES

Many coumarins have been shown to relax the contractions of vascular smooth muscle induced by various mediators, in particular by the sympathomimetics norepinephrine and phenylephrine or by high doses of potassium chloride (KCl), as well as by endothelin-1 and an analogue of the endoperoxide prostaglandin H_2 named U-46619 [18]. Despite the vast differences in the chemical structure of coumarins, a mechanism of action based on influencing calcium kinetics seems to be common for a majority of them. Coumarins may exert influence on both endothelium-based and endothelium-independent vasorelaxation. Because some coumarins have influenced both mechanisms, they are summarized altogether (a detailed analysis is given in Table 1).

A large number of coumarins act predominantly via an endothelium-independent mechanism. Those substances did not influence the steady-state of vascular rings, but they were able to relax contractions induced by the above-mentioned inducers [18-20]. Coumarins act in a dose-dependent manner and probably block calcium entry through both voltage-dependent calcium channels (VDCC) and receptor-operated calcium channels (ROCC) located in the membrane of vascular smooth muscle cells, and/or by inhibiting calcium release from the sarcoplasmic reticulum [18-25]. Although competitive antagonism at 5-HT receptors could also be partially responsible, the main mechanism is to block the entry of Ca^{2+} through the membrane channels and subsequent release from intracellular stores [18, 21, 26].

Imperatorin (Table 1 - C7), a furanocoumarin derivate, at concentrations higher than $10 \mu M$ was able to inhibit Ca^{2+} -influx through VDCC and ROCC and the subsequent release of Ca^{2+} from intracellular stores by interfering with the inositol-1,4,5-trisphosphate pathway [18]. A similar conclusion was also reached by Oliveira *et al.* (2001), who tested the relaxant effect of scopoletin (Table 1 - C1). However, the above two studies differed in terms of the reported ability to relax contraction evoked by caffeine: while imperatorin was able to markedly suppress this contraction, scopoletin had no effect [18, 21]. Muscarinic receptors apparently did not play a role in the effects of imperatorin on blood vessels [27]. The vasorelaxant activity of imperatorin can be improved by increasing its solubility by incorporating the nitrogen atom into the molecule. Such a compound, 8-(2-(azepan-1-yl)ethoxy)psoralen (Table 1 - C6), is more effective than imperatorin. The other changes such as incorporating a morpholine ring, extending the length of the side chain or incorporating a hydrophobic benzene ring onto the nitrogen decrease its vasorelaxant activity. Neither the dimethyl group nor the olefinic bond are essential for its activity [28]. On the contrary, lengthening or changing the position of the side chain decreases the vasodilatory activity when compared to imperatorin [22, 28].

Some pyranocoumarins, e.g., pteryxin (Fig. 3 - C20), (+)-praepruptorin A (Table 1 - C4) and (\pm)-praepruptorin A (Table 1 - C4 and C5), have a stronger relaxant effect against constriction evoked by KCl than by norepinephrine. These compounds have a predominantly antagonistic effect on VDCC [24]. Lee *et al.* (2008) reached a similar conclusion by testing (+)-praepruptorin A relaxant abilities on rat aorta contracted by phenylephrine. The addition of nifedipine, a VDCC blocker, significantly attenuated the effect of (+)-praepruptorin A [25]. Using various types of blood vessels

Table 1. Simplified overview of *in vitro* studies of coumarins and their vasorelaxant effect on vascular smooth muscle.

Ref.	Coumarin	Chemical Formula	KCl	Sympathomimetics	Serotonin	Others
[21]	scopoletin (7-hydroxy-6-methoxycoumarin, C1)		1	1 ^A	1	C
[26, 29]	scoparone (6,7-dimethoxycoumarin, C2)			4	1	D
[39]	6-guanidinocoumarin			1		
[39]	6-(4,6-dimethylpyrimidin-2-ylamino)coumarin			1		
[31]	osthole (7-methoxy-8-isopentenylcoumarin, C3)			4		
[39]	7-methoxy-8-(3-(thiophen-2-yl)acryloyl)coumarin			1		
[39]	7-methoxy-8-(3-(4-(trifluoromethyl)phenyl)acryloyl)coumarin			1		
[40]	1,4-dihydropyridine derivatives of coumarin - the most active: 1,4-dihydro-4-(2-oxo-2H-chromen-8-yl)2,6-dimethylpyridine-3,5-dicarboxylate		5			
[41]	coumarin-resveratrol hybrids - the most active 6-hydroxy-3-(3',5'-dihydroxyphenyl)coumarin			3		
[42]	6-halogen derivatives of 3-phenylcoumarin the most active: 6-chloro-3-(2'-hydroxy)phenylcoumarin			3		
[25, 30]	(+)-praeurptorin A /(+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone, C4/		3-4 ^B	3 ^B		

(Table 1) contd....

Ref.	Coumarin	Chemical Formula	KCl	Sympathomimetics	Serotonin	Others
[30]	(-)-praeurptorin A /(-)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylhellactone, C5/		3 ^A	3 ^A		
[28]	8-derivatives of psoralen - the most active: 8-(2-(azepan-1-yl)ethoxy)psoralen (C6)			5		
[18-20, 22, 27, 28]	imperatorin/8-(3-methylbut-2-enoxy)psoralen, C7/		3	3-4 ^B		E
[22]	isoimperatorin/5-(3-methylbut-2-enoxy)psoralen/			3		
[24]	8-methoxypsoralen (C8)		0			

0 - non significant vs. control, 1 - slight effect or the effect was observed at very high concentrations (more than 100 μM), 2 - intermediate effect - IC_{50} value 50-100 μM , 3 - good effect - IC_{50} value 10-50 μM , 4 - excellent effect - IC_{50} value 1-10 μM , 5 - IC_{50} value below 1 μM .

A - IC_{50} was not significantly affected after endothelium removal

B - IC_{50} increased after endothelium removal

C - no effect on contraction induced by caffeine

D - a good effect against contraction caused by angiotensin II and slight effect against contraction caused by histamine

E - effective against caffeine induced contractions

Sympathomimetics here mean norepinephrine or phenylephrine.

may explain some discrepancies among the studies because of a different involvement of both Ca^{2+} -channels, i.e., VDCC and ROCC [29]. For example, scoparone (Table 1 - C2) did not affect KCl-induced contraction in the rabbit thoracic aorta, but if the contractions were induced by norepinephrine, they were markedly reduced. In contrast, scoparone dilated both KCl- and norepinephrine-contracted rings of the rabbit ear artery. The authors suggested that these differences could be explained by the higher channel conductance of VDCC in the rabbit ear artery than in the aorta [29]. On the other hand, 8-methoxy-psoralen (Table 1 - C8) had the opposite effect. This compound was able to relax constriction caused by phenylephrine without effect on KCl-induced contraction. The explanation for this phenomenon is unknown, but selective VDCC can be excluded [24].

It was found that the vasodilation induced by the tested coumarins was not mediated by interaction with other receptors such as β -adrenoreceptors, muscarinic receptors or ATP-dependent potassium channels or the inwardly rectifying potassium channel [18, 22, 25].

Several coumarins have exhibited endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle by increasing NO production, which activates guanylyl cyclase. An increase in cGMP concentration leads to a decrease in cytosolic Ca^{2+} concentration [30]. NO is synthesized by the oxidation of L-arginin in the presence of endothelial NO synthase (eNOS), activated by phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B (Akt). A more detailed examination of mechanisms of action has shown that osthole (Table 1 - C3) increased the phosphorylation of Akt on Ser-473 and eNOS on Ser-1177. In addition, the inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase decreased the effect of osthole, confirming the mechanism of action [31].

There are even differences between individual enantiomers. (+)-Praeaurptorin A was more potent in the induction of relaxation after the administration of phenylephrine or KCl than (-)-praeurptorin A (Table 1 - C5). Both enantiomers exhibited a concentration-dependent relaxation, however endothelium removal decreased the relaxant effect of (+)-praeurptorin A but not that of (-)-praeurptorin A. The

same result was observed after the administration of an inhibitor of NO synthase L-NAME (N° -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride). Moreover, an inhibition of guanylyl cyclase decreased the vasorelaxant effect of (+)-praeuroptorin A, but an inhibition of cyclooxygenase, blockade of muscarinic receptors or non-selective blockade of potassium channels had no such effect. Thus, the effect of (+)-praeuroptorin A is apparently endothelium/NO-dependent, in contrast to its (-)-enantiomer [23, 25].

On the other hand, some coumarins, such as scopoletin, imperatorin or (-)-praeuroptorin A (Table 1 - C1, 7 and 5, respectively), did not exhibit any significant decrease in relaxation after endothelium removal or the addition of L-NAME. Therefore it can be concluded that the endothelium did not play an important role in the relaxation induced by those coumarins [21].

In vivo Studies

In a dose-dependent manner, coumarins by relaxation of aorta and peripheral arteries decreased systolic and diastolic blood pressure and vascular peripheral resistance. They were also able to increase coronary blood flow by dilatation of the coronary arteries [20, 23, 32, 33]. Osthole in a dose of 50 mg/kg was administered each day as part of a diet to stroke-prone spontaneously hypertensive rats for four weeks. After three weeks their systolic blood pressure was reduced by about 10% [34]. The same substance administered in lower doses, 10 mg/kg and 20 mg/kg, by gavage to rats with induced renovascular hypertension, did not significantly reduce systolic blood pressure after four weeks of treatment versus the control group. But at 2 and 4 weeks of the post-treatment period, the systolic blood pressure decreased. With 20 mg/kg/day, the decrease was about 15% in the second week and 19% in the fourth week, 10 mg/kg/day caused a smaller decrease [35]. Imperatorin administered intragastrically in a dose of 25 mg/kg to spontaneously hypertensive rats (SHR) significantly decreased blood pressure after one week, while lower doses (12.5 and 6.25 mg/kg) induced a notable change 35 and 39 days after administration. After 13 weeks of treatment with 25 mg/kg, systolic blood pressure was reduced by about 30 mmHg (18%) in comparison to the placebo group [20]. Praeuroptorin C (Fig. 3 - C21) in a dose of 20 mg/kg decreased systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats by about 19% after eight weeks of administration. Although the authors have linked the effect with the observed up-regulation of phospholamban mRNA, other mechanisms are probably responsible for it [23]. (\pm)-Praeuroptorin A had a similar effect on the heart to diltiazem, but diltiazem is ten times as potent, and while diltiazem caused bradycardia, (\pm)-praeuroptorin A did not inhibit the action of sinus node and atrioventricular conduction but on the contrary led to an increase in heart rate [33]. Coumarin glycosides isolated from *Daucus carota* administered in the dose range 1 to 10 mg/kg lowered blood pressure, but the heart rate decreased by about 10-15% at the highest dose of 10 mg/kg [36].

Campos-Toimil *et al.* (2002) showed during *in vitro* experiments on rat aorta rings that carbocromen (3- β -diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxycarbonylmethoxycoumarin, sometimes also spelled carbocromen or carbocromene, Table 4 - C18) and simple coumarins, i.e., 7,8-

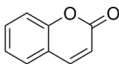
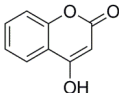
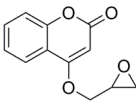
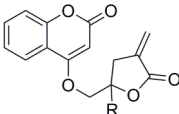
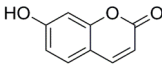
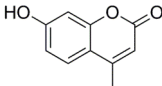
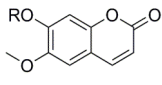
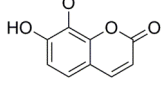
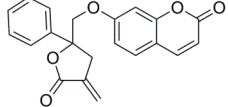
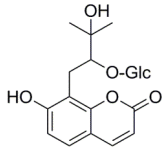
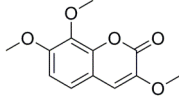
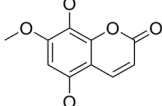
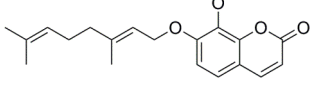
dihydroxy-4-hydroxymethylcoumarin and its bis(acetonyl) derivate (Fig. 3 - C22 and 23), did not significantly modify the contraction induced by norepinephrine or KCl. However, during *in vivo* studies, vasorelaxant effects of carbocromen on large coronary arteries were reported. Thus it seems that carbocromen is selective for coronary arteries without affecting systemic arterial blood pressure [37, 38]. This high selectivity has also been proposed for cloricromen (also spelled cloricromene by some authors or known as AD6, 8-chloro-3- β -diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxycarbonylmethoxycoumarin, Table 2 - C12), which caused stronger and longer coronary vasorelaxation than carbocromen. Both coumarins increased the coronary blood flow via the above-mentioned mechanism and had no effect on myocardial contractility, the duration of systole and metabolic rate [38].

EFFECTS ON PLATELET FUNCTION

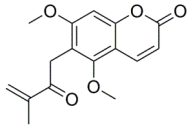
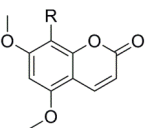
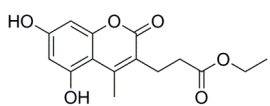
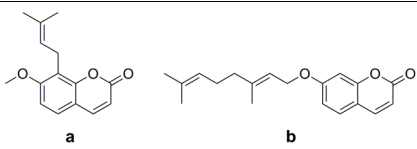
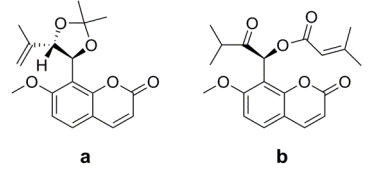
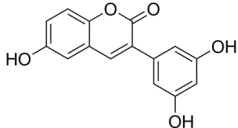
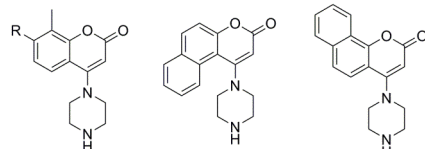
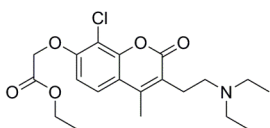
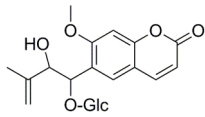
There are many articles analysing the antiplatelet activity of coumarins, a simplified summary is given in Tables 2 and 3. Their comparison is not easy, because the concentrations of the aggregation inducers and the tested compounds were not identical. In many cases acetylsalicylic acid was used as a comparator, but the concentration was not always the same and acetylsalicylic acid was not able to block the aggregation started by ADP or thrombin. Moreover, some researchers tested only one or several concentrations, some plotted concentration-effect curves but only reported IC_{50} . The effective concentration should not be taken as an insurmountable factor, because generally the platelet inducer may be somehow artificial, e.g., a stable agonist of thromboxane receptors U-46619 or the extracellular administration of arachidonic acid (AA). Thus the concentration needed to evoke an effect on a human being might be lower. This can be demonstrated by the fact that acetylsalicylic acid is clinically used in quite low doses but the IC_{50} of acetylsalicylic acid on AA (50 μ M) induced aggregation was quite high in rat platelet suspension - 60 μ M [43], while in another study 56 μ M of acetylsalicylic acid was sufficient to completely block platelet aggregation started by 100 μ M of AA in a rabbit platelet suspension [44]. In both cases, the platelet concentration was almost identical. Thus the lowest effective concentration cannot be easily established but, on the other hand, it may be considered that since some coumarins only have an effect at concentrations higher than 100 μ M, they would very likely have no pharmacological effect in clinical settings.

Based on their structure, coumarins are able to block the platelet aggregation induced by various mediators. Many compounds even reached the activity of the comparator and appear to be suitable for future testing. Only a few articles analysed the mechanism of action, which is again highly variable, likely due to vast differences in their chemical structures. In general, the antiplatelet activity of coumarins seems to be reversible in most cases [45-47] but inhibitors of phospholipase A_2 may act as irreversible inhibitors [48]. Similarly to structurally related flavonoids, the blockade of thromboxane production from AA may be one of their possible effects [14, 46, 47]. This effect may be mediated by both the inhibition of cyclooxygenase and/or thromboxane synthase. Our group has recently shown that 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarins (Table 2 - C11) did not influence thromboxane synthase but blocked cyclooxygenase-1 even at

Table 2. Simplified overview of *in vitro* studies with simple coumarins on inhibition of platelet aggregation activated by various inducers. The table summarizes the best effect on platelet aggregation; where multiple compounds were tested, the result shows the most active one.

Ref.	Coumarin(s)	Chemical Formula of the Most Active Compound(s)	AA	Collagen	ADP	Thrombin	PAF	Ca- ionophore A23187	U-46619
[43]	coumarin (C9)		1	0					1
[47]	4-hydroxycoumarin		0	0	0				
[44]	simple derivatives of 4-hydroxycoumarin - the most active was 4-[(oxiran-2-yl)methoxy]-2H-1-benzopyran-2-one		1	1		0	1		
[44]	derivatives of 4-hydroxycoumarin with α -methylene- γ -butyrolactone (R = CH ₃ , C ₆ H ₅ , 4-F-C ₆ H ₄ , 4-Cl-C ₆ H ₄ , 4-CH ₃ -C ₆ H ₄ or 4-CH ₃ O-C ₆ H ₄)		4	1-4 ^b		1-4 ^b	4		
[47, 50, 53]	7-hydroxycoumarin (umbelliferone, C10)		1	1	0	0	0-1		
[47]	4-methyl-7-hydroxycoumarin (4-methylumbelliferone)		0	0	0				
[47]	7-hydroxy-6-methoxycoumarin (scopoletin, R = H, partly active) and its β -D-glycoside scopolin (R = β -D-glycoside, inactive)		0-1	0-1	1				
[53]	7-hydroxy-8-methoxycoumarin (hydrangetin)		1	1			0		
[50, 51]	derivatives of 7-hydroxycoumarin with α -methylene- γ -butyrolactone		4	1-4 ^b		1-4 ^b	4 ^c		
[54]	8-(2'-O- β -D-glucopyranosyl-3'-methyl-3'-hydroxybutyl)-umbelliferon		1 ^d	0	0-1 ^d			0	
[53]	3,7,8-trimethoxycoumarin (schinocoumarin)		1-4 ^b	0			0		
[55]	5,7,8-trimethoxycoumarin		1	1		0	1		
[53]	7,8-derivatives of coumarin		3 ^e	2			0		

(Table 2) contd....

Ref.	Coumarin(s)	Chemical Formula of the Most Active Compound(s)	AA	Collagen	ADP	Thrombin	PAF	Ca- ionophore A23187	U-46619
[55]	6-derivatives of 5,7-dimethoxycoumarin toddanol, toddanone (the most active and shown in the figure) and toddalolactone		1-2 ^f	0	0		0		
[56]	5,6,8-derivatives of 7-methoxycoumarin/R = CH ₂ COCH(CH ₃) ₂ or CH ₂ CHOHC(CH ₃)=CH ₂ /		2	2		0 ^g	2		
[47]	various derivatives of 4-methylcoumarin - the most active were 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarins (C11)		4	1	1				
[46]	6,7-derivatives of coumarins - suberosin (a) and auraptin (b)		2	1	1	0	1		1
[57]	8-derivatives of 7-hydroxycoumarin minimicroline acetonide (a) and epimurpaniculol senecioate (b)		1	2-3		0 ^g /1	1		
[41]	3-arylcoumarins/6-hydroxy-3-(3',5'-dihydroxyphenyl)coumarins was the most active/					3			
[58-61]	4-(1-piperazinyl)-derivatives R = 2-morpholinoethoxy or pyridin-3-ylmethoxy (Fig. 2)			4	4	4		4	
[45, 62]	cloricromen (8-chloro-3-β-diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxy-carbonylmethoxy coumarin, C12)		2-4	4	4	4	4	3-4 ^h	3-4 ^h
[63]	11-O-β-D-glucopyranosyl thamnomin		0 ⁱ		0		0 ⁱ		

0: non significant vs control, 1: slight effect or the effect was observed at very high concentrations (more than 100 μM), 2: intermediate effect - a significant effect observed at concentrations from 50 to 100 μM, 3: good effect - a significant effect in concentrations below 50 μM, 4: excellent effect - a significant effect at less than 10 μM

Data on warfarin (a simple coumarin) are shown in Table 3.

^a although it has little effect with common inducers, its IC₅₀ on adrenaline-induced platelet aggregation in the presence of collagen was 58 μM (that of ASA was 50 μM)

^b the compound or some of the tested compound(s) completely abolished the aggregation but the concentrations were > 250 μM, no additional data given

^c IC₅₀ of the most potent compound in the range 10-20 μM

^d statistical analysis missing and tested concentrations approached 1 mM

^e one compound at a concentration of 61 μM caused more than 50% inhibition

^f the compound was partly active at concentrations > 250 μM, no additional data given

^g interestingly, rather an opposite effect (proaggregation) was observed instead

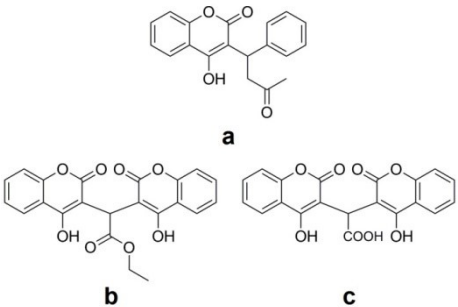
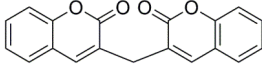
^h only results with 50 μM are shown

ⁱ only concentrations of about 20 μM were tested and a non-significant tendency was observed.

Table 3. Simplified overview of *in vitro* studies with complex coumarins on inhibition of platelet aggregation activated by various inducers. The table summarizes the best effect on platelet aggregation; where multiple compounds were tested, the result is for the most active.

Ref.	Coumarin Type	Coumarin(s)	Chemical Formula of the Most Active Compound(s)	AA	Collagen	ADP	Thrombin	PAF	Ca-ionophore A23187	U-46619
[63]	furano	12-O-β-D-glucopyranosyl gosferol		0		0 ^a		0		
[64]	furano	decuroside (R = sugar, R' = H or OH) and nodakenin (R = sugar, R' = H)				2				
[55]	furano	isopimpinellin		1-3 ^b	0	0		0		
[54]	furano	3 different structures		1-4 ^c	1 ^c	0-1 ^c			0	
[65]	furano	heraclenol (shown in the figure, also tested were its glycoside and a dimer with a pyranocoumarin)		0		0		1		
[46]	pyrano	poncitrin (R = OCH ₃ , R' = 2-methylbut-3-en-2-yl), xanthyletin (R = R' = H) and xanthoxyletin (R = OCH ₃ , R' = H)		3-4 ^d	1	1	0	2		1
[49]	pyrano	3',4'-diisovalerylhellactone diester (C13)		2	3		1	4		
[55]	pyrano	braylin		1-4 ^e	1-3 ^f			1		
[66]	pyrimidino	4-derivatives of 2-methanesulfonyl-5H-[1]benzopyrano[4,3-d]pyrimidin-5-one (R = morpholino, piperidino, pyrrolidino)		4 ^g		4 ^g				4

(Table 3) contd....

Ref.	Coumarin Type	Coumarin(s)	Chemical Formula of the Most Active Compound(s)	AA	Collagen	ADP	Thrombin	PAF	Ca-ionophore A23187	U-46619
[67]	simple/bis	warfarin (a), ethylbiscoumacetate (b) and biscoumacetic acid (c, metabolite of the latter)				1 ^b				
[46]	bis	dicoumarol		1	1	0	0	0		0

0: non-significant vs control, 1: slight effect or the effect was observed at very high concentrations (more than 100 μM), 2: intermediate effect - a significant effect observed at concentrations from 50 to 100 μM , 3: good effect - a significant effect at concentrations below 50 μM , 4: excellent effect - a significant effect at less than 10 μM

Data on 4-(1-piperazinyl)-derivatives of benzocoumarins are given in Table 2.

^a only concentrations of about 20 μM was tested and a non-significant tendency was observed

^b effective at 200 μM - reduction in aggregation of 89 to 20%, but no additional data given

^c statistical analysis missing and the tested concentrations approached 1 mM

^d IC_{50} of xanthoxyletin was 30 μM , the lowest effective concentration not shown

^e the compound or some of the tested compound(s) completely abolished the aggregation, but the concentrations were > 250 μM , no additional data given

^f the compound was partly active at concentrations > 250 μM , no additional data given

^g IC_{50} of the most potent compound in the range 10-20 μM

^h with warfarin, IC_{50} is not clinically relevant - about 7 mM

lower concentrations than acetylsalicylic acid. In addition, these coumarins also had a significant effect on another step of aggregation: they probably acted as antagonists at thromboxane receptors [47]. Interestingly other coumarins, both simple and pyrano, appeared to also act at the level of AA transformation into thromboxane, in addition to acting on the phosphoinositol pathway mediated by ADP and the platelet-activating factor (PAF) [46]. In contrast, 3',4'-diisovalerylhellactone diester (Table 3 - C13) probably acted as an antagonist at PAF receptors without having blocked cyclooxygenase-1 or thromboxane synthase [49]. The basic core of coumarins clearly has the potential to influence PAF and thrombin based pathways, since its replacement with naftalene, xanthrone or even flavone in compounds bearing the active α -methylene- γ -butyrolactone moiety substantially decreased the effect on both of the above-mentioned pathways [44, 50-52]. A very interesting and less common mechanism of action includes the inhibition of phospholipase A_2 activation or enzymatic activity; and the inhibition of phosphodiesterase 3. Data on these compounds are more numerous and are summarized in the text below.

The group of Roma *et al.* rationally synthesized a large series of coumarin derivatives with 1-piperazinyl at position 4. Some of their compounds, in particular 8-methyl-4-(1-piperazinyl)-7-(3-pyridinylmethoxy)-2H-1-benzopyran-2-one (Fig. 2a, C15) were remarkably efficient inhibitors of various aggregation inducers (ADP, collagen, calcium ionophore A23187 and thrombin). The IC_{50} of the above-mentioned compound was around 1-2 μM or even lower. Its close analogue 8-methyl-7-(2-morpholinoethoxy)-4-(1-piperazinyl)-2H-1-benzopyran-2-one (Fig. 2b, C16) was

slightly less potent on ADP and calcium ionophore-induced aggregation, but its IC_{50} on collagen-induced aggregation was 284 nM. The mechanism of action of the former was examined in detail and included the inhibition of phosphodiesterase 3 with an IC_{50} of 37 nM, so an order of magnitude lower than that of the known inhibitors cilostazol and milrinone. Phosphodiesterase inhibition leads to the accumulation of cAMP, and this was probably associated with antiplatelet activity on all the above-mentioned aggregation inducers. Possible participation of the cyclooxygenase pathway can be excluded, since preincubation with acetylsalicylic acid did not significantly change the IC_{50} [58-61].

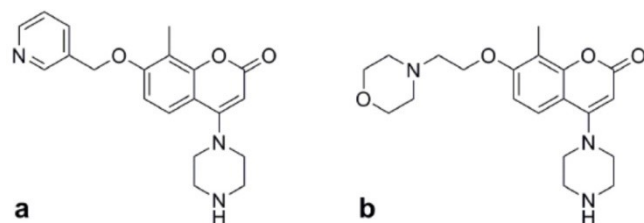


Fig. (2). The most efficient 1-piperazinyl derivatives of coumarins. **a**: 8-methyl-4-(1-piperazinyl)-7-(3-pyridinylmethoxy)-2H-1-benzopyran-2-one (C15), **b**: 8-methyl-7-(2-morpholinoethoxy)-4-(1-piperazinyl)-2H-1-benzopyran-2-one (C16).

Cloricromen (Table 2 - C12) is also able to block the aggregation induced by various inducers including adrenaline. In rabbits it only partially inhibited ADP-induced aggregation, while its effect on collagen-induced aggregation was more pronounced. In human platelet-rich plasma, cloricromen was markedly effective at inhibiting both ADP- and

collagen-induced aggregation, with a substantial effect at 10 μM and even some effect at 1 μM . Similarly, another study found cloricromen to be highly effective on PAF-induced aggregation at the μM level. The effect on the aggregation pathway started by exogenously administered AA was much lower and only substantial at high concentrations. Moreover, combination with acetylsalicylic acid may lead to a synergic action. This is in agreement with the finding that this coumarin acts upstream of the inhibition of cyclooxygenase, because it inhibited the release of AA from platelets stimulated with thrombin. Thus a possible interference with phospholipase A_2 was likely, in particular because other coumarins, umbelliferone (Table 2 - C10) and ethyl coumarin-3-carboxylate (Fig. 3 - C24), are potent inhibitors of different phospholipases A_2 , with IC_{50} in nM concentrations, and both have antiplatelet effects. In contrast, the direct inhibition of this enzyme by cloricromen was not documented. However, it was shown that cloricromen likely interferes with the G protein-mediated activation of phospholipase A_2 . Based on these experimental results, the blockade of phospholipase C and an increase in cAMP can be excluded as a mechanism of cloricromen action. In agreement with these data, cloricromen was able to markedly inhibit the phospholipase A_2 -dependent release of PAF from leucocytes stimulated with Ca-ionophore A23187 [45, 48, 62, 68-72]. Thus the drug by interference with ADP-, PAF-, thrombin- and collagen-based pathways might be active inhibitor of the aggregation process, where both collagen and the other above-mentioned soluble agonists play a role [73]. Since cloricromen appears to be a very safe compound (500 mM was tolerated well by freshly isolated resident alveolar macrophages for 24 hours) with additional positive activities (anti-inflammatory activity due to inhibition of the NF- κB pathway, antioxidant properties) [74, 75], its possible use in humans was tested. However, the result was disappointing, the drug was not able to influence platelet aggregation 2, 4 or 6 hours after the ad-

ministration of 300 mg of cloricromen in healthy volunteers (Table 3). The reasons for this failure are not clear, but rapid metabolism and/or reversibility of the antiplatelet activity may be responsible [62, 69, 76].

Other data on *in vivo* models or clinical settings are sparse. In addition to cloricromen's failure to influence platelet aggregation in volunteers, it also failed to improve the condition of patients with intermittent claudication treated with acetylsalicylic acid. There were only insignificant tendencies to improve their condition [77]. Similarly, the pyranocoumarin seselin (Fig. 3 - C25) failed, in contrast to acetylsalicylic acid, to provide protection against pulmonary thromboembolism in mice [78].

A few studies confirmed that clinically used anticoagulants have generally low or no direct antiplatelet potential. However, some interactions based on pharmacokinetics were found between clopidogrel and phenprocoumon (Table 5 - C28), and a pro-aggregatory effect on platelet aggregation with nicoumalone (acenocoumarol, Table 5 - C29) was observed [79, 80].

EFFECTS ON MODELS OF ISCHAEMIC HEART DISEASE, DYSRHYTHMIAS AND CHRONIC HEART FAILURE

Few studies have tested the effects of coumarins on experimental major cardiovascular diseases, namely arterial hypertension (summarized in the section VASORELAXANT PROPERTIES), ischaemic heart disease, myocardial infarction/damage, cardiac dysrhythmias and haemorrhagic shock.

The tested coumarins exhibited mostly positive effects in experimental models of serious diseases of the cardiovascular system, but also some negative. A deeper understanding of the mechanisms of action of coumarins in these diseases

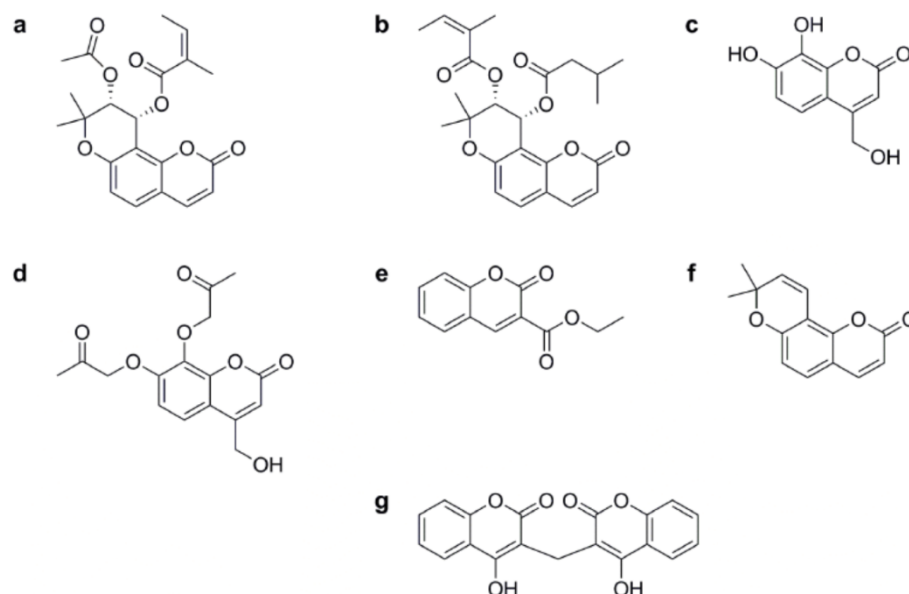


Fig. (3). Chemical structures of other mentioned coumarins. **a:** pteryxin (C20), **b:** praeruptorin C (C21), **c:** 7,8-dihydroxy-4-hydroxymethylcoumarin (C22), **d:** bis(acetonyl) derivate of 7,8-dihydroxy-4-hydroxymethylcoumarin (C23), **e:** ethyl coumarin-3-carboxylate (C24), **f:** seselin (C25), **g:** 3,3'-methylenebis(4-hydroxycoumarin) (C26).

requires further detailed studies. In summary, the principal positive effects of coumarins mentioned in Table 4 are as follows:

- an improvement in lipid metabolism and an increase in glycolytic metabolism (osthole, Tables 1 or 4 - C3);
- a vasodilating effect caused by Ca²⁺-channel blockade or by the elevation of cGMP (osthole);
- an antidysrhythmic activity accompanied by a prolongation of action potential duration and prolongation of the refractory period (cloricromen, Tables 2 or 4 - C12);
- a membrane stabilizing effect and β -adrenoceptor blocking activity (bucumolol, Table 4 - C17);
- dilatation of coronary blood vessels (7-hydroxycoumarin /Table 2 or Table 4 - C10/ and carbocromen /Table 4 - C18/), better oxygen utilization by mitochondria (carbocromen);
- a positive effect on cardiac metabolism caused by an increase in cAMP (carbocromen);
- reduction in the infarction size by inhibiting leucocytes infiltration (cloricromen);
- anti-inflammatory and antioxidant effects, a decrease in lipid peroxidation (osthole);
- a decrease in myocardial damage induced by isoproterenol by decreased lipid peroxidation (marmesinin, Table 4 - C19);
- a positive effect during haemorrhagic shock by reversing myocardial failure (cloricromen).

A direct vasodilatory effect may not be purely beneficial, because it could include vasodilation of shunt colaterals in the heart, which may be deleterious due to the diversion of blood from ischaemic parts (carbocromen).

Calcium channel blocking properties may be the basis for the cardiodepressant activity of some coumarins. Scopoletin (Table 1 - C1) had a negative chronotropic effect as well as a negative inotropic effect on the atria from pigs. This effect was not mediated by muscarinic receptors [81]. Similarly, the introduction of a coumarin core at position 4 in dihydropyridines led to a compound with vasorelaxant properties and/or negative chronotropic and/or inotropic effects (on atria). Moreover, several phenylcoumarin derivatives exhibited an inhibiting effect on contractility, while coumarin derivatives exhibited quite good negative chronotropic effects [40].

CLINICAL SUMMARY OF ORAL ANTICOAGULANT THERAPY WITH COUMARINS

Coumarin derivatives are widely used oral anticoagulants [93]. Their history began in the 1920s, when an unusual disease characterised by fatal bleeding, either spontaneously or from minor injuries, was observed in cattle in the Northern USA and Canada. Mouldy silage made from sweet clover (*Melilotus alba* and *Melilotus officinalis*) was implicated, and it was shown that it contained a haemorrhagic factor that reduced the activity of prothrombin. It was not until the 1940s that it was discovered in Wisconsin that the anticoagulant component of sweet clover was 3,3'-methylenebis(4-hydroxycoumarin), Fig. 3 - C26. Further work led in 1948 to

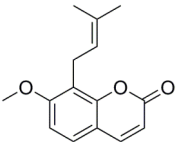
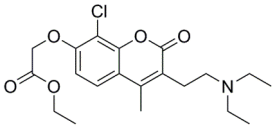
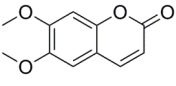
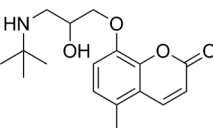
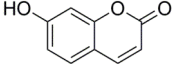
the synthesis of warfarin (Table 5 - C27), which was initially approved as a rodenticide in USA in 1952. It has been used in humans since 1954. The name warfarin is derived from WARF (Wisconsin Alumni Research Foundation) and the suffix-ARIN, which identifies it as a coumarin [94]. Nowadays warfarin is the most widely used anticoagulant in the world with annual prescriptions amounting to 0.5-1.5 % of the population [95]. Warfarin is the first-choice coumarin anticoagulant in the USA, Canada, the United Kingdom and many other countries around the world. Apart from warfarin, other coumarin derivatives are used as anticoagulants in some countries. The most common are acenocoumarol and phenprocoumon (Table 5 - C29 and C28), which are used in some European countries (e.g., Germany, The Netherlands). For example, more than 200,000 prescriptions for phenprocoumon and more than 1 million for acenocoumarol were registered in 2008 in The Netherlands [93, 96, 97].

The anticoagulant effect of these substances is due to the inhibition of vitamin K epoxide reductase (Fig. 4), which leads to the depletion of several coagulation factors including factors II, VII, IX and X, whose formation is dependent on vitamin K (Fig. 4) [97, 98]. Warfarin has a single chiral centre that gives rise to two different enantiomeric forms, of which the S-form is approximately 2- to 5-fold more potent than its R-counterpart. In clinical situations, a racemic 50:50 mixture of both enantiomers is administered orally [97]. The individual anticoagulants from the coumarins class differ in their pharmacokinetic properties, of which the most important is the elimination half-life. Acenocoumarol has the shortest half-life (about 10 hours) followed by warfarin (36-42 h) and then phenprocoumon (up to 140 h) [93]. A comparison of the selected pharmacokinetic parameters of vitamin K antagonists is shown in Table 5.

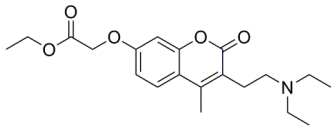
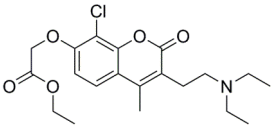
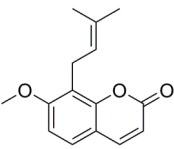
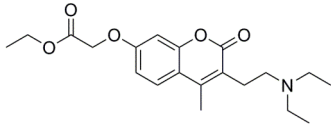
The clinical effectiveness of coumarin anticoagulants (most studies have been performed with warfarin) has been established by well-designed clinical trials [98] and confirmed by meta-analysis of these trials. Coumarin anticoagulants are effective in the treatment and prevention of arterial and venous thrombosis [93]. Nowadays, the main clinical use of coumarin anticoagulants is the prevention of stroke or systemic embolism in patients with atrial fibrillation, which is one of the most common cardiac disorders with a prevalence of around 1% of the population in the US, Canada and the majority of European countries [99, 100]. Other current uses are:

- the primary and secondary prevention of venous thromboembolism [98];
- the prevention of systemic embolism or stroke in patients with prosthetic heart valves [101-104];
- the prevention of acute myocardial infarction in patients with peripheral arterial disease [105];
- the treatment of antiphospholipid syndrome [106];
- the prevention of systemic embolism in high risk patients with mitral stenosis and prevention of systemic embolism in patients with presumed systemic embolism, either cryptogenic or in association with a patent foramen ovale (its effectiveness has not been proved by randomized clinical trials) [98].

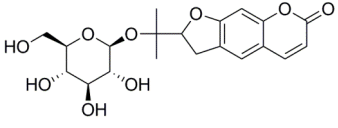
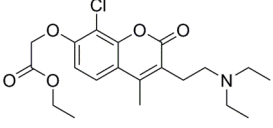
Table 4. Effects of selected coumarins on experimental major cardiovascular diseases.

Ref.	Coumarin	Chemical Formula	Pathological State	Experimental Animal	Methods	Results
Cardiac hypertrophy caused by hypertension						
[35]	osthole (C3)		Cardiac hypertrophy caused by renovascular hypertension.	rat ♂	Gavage, 10 or 20 mg/kg/d for 4 weeks.	The higher dose of osthole reduced heart/body weight index (week 4), the lower dose had no significant effect.
Experimental dysrhythmias						
[82]	cloricromen (C12)		Experimental dysrhythmias.	<i>In vivo</i> rat ♂ and cat, <i>in vitro</i> guinea pig isolated cardiomyocytes.	Aconitine in rats (i.v. 0.25 µg/min until VPB occur) and adrenaline in cats - 3 µg/kg i.v. bolus, an increased potential to induce ventricular dysrhythmias. <i>In vitro</i> functional refractory periods in atrial and ventricular muscle.	Cloricromen at i.v. doses of 2.5-10 mg/kg antagonized the dysrhythmic potential of aconitine and adrenaline. <i>In vitro</i> cloricromen (20-50 µM) prolonged action potential duration and functional refractory period.
[83]	6,7-dimethoxycoumarin		Experimental dysrhythmia.	Rat (sex not specified)	Aconitine i.v. 20 µg/kg; 6,7-dimethoxycoumarin in doses of 33-500 mg/kg ig, procainamide 100-800 mg/kg ig.	6,7-dimethoxycoumarin was more potent at reducing occurrence of VPB than procainamide.
Experimental dysrhythmias						
[84]	dl-bucumolol (C17)		Experimental dysrhythmias.	dog ♂♀ (mongrel)	Atrial dysrhythmia produced by local application of aconitine onto atrial surface in dogs. Ventricular dysrhythmia produced by ouabain (40 µg/kg i.v.). Racemic bucumolol or its isomers were given i.v. (0.5 mg/kg/min) until antidysrhythmic effect occurred.	In both trials, effective doses of bucumolol or its stereoisomers were in the range of 2.8 to 6.2 mg/kg
Myocardial ischaemia/reperfusion (I/R)						
[32]	7-hydroxycoumarin (umbelliferone, C10)		Myocardial I/R (isolated perfused rat heart).	rat ♂	30 min zero-flow ischaemia followed by 45 min of reperfusion (30I/45R).	10 min R: an increase in coronary blood flow (7-hydroxycoumarin 10 ⁻⁴ M) An increase in left ventricular developed pressure after reperfusion at a concentration of 10 ⁻⁵ M.

(Table 4) contd....

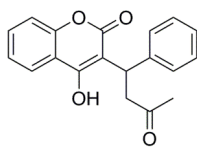
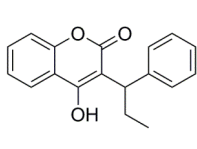
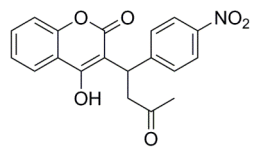
Ref.	Coumarin	Chemical Formula	Pathological State	Experimental Animal	Methods	Results
[85]	carbocromen (C18)		A brief intermittent myocardial ischaemia.	dog ♂♀ (mongrel)	ST segment of the epicardial ECG as a parameter of intermittent ischaemia.	Carbocromen improved ischaemia.
[86]	cloricromen		Myocardial I/R <i>in vivo</i> by occlusion of the circumflex coronary artery.	rabbit (sex not specified)	A single dose of cloricromen (0.25 mg/kg i.v.) for 4 days, 5 th day occlusion (50 min) with infusion of cloricromen (6.4 µg/kg/min) followed by 20 min of reperfusion.	Cloricromen caused a smaller ST segment elevation, decreased the number of ventricular fibrillations, a reduced necrotic area compared to the controls.
[87]			Myocardial I/R by occlusion of left coronary artery.	rabbit ♂	Infusion of cloricromen (30 or 300 µg/kg/min) 15 min before I60/R120, continued during the experiment.	Cloricromen at both rates of infusion reduced infarction size and MPO activity. Higher dose of cloricromen also reduced ST-segment elevation during I.
Myocardial ischaemia/reperfusion (I/R)						
[88]	osthole		Myocardial I/R injury, LAD occlusion.	rat ♂	I30/R120 induced by LAD occlusion. Osthole was administered at doses of 1, 10, 50 mg/kg i.p. upon initiation of I.	Osthole reduced myocardial damage and improved haemodynamic parameters after I/R injury, increased activities antioxidant enzymes, decreased products of lipid peroxidation, decreased proinflammatory cytokines in most cases in a dose-dependent manner.
[89]	carbocromen		Myocardial I/R injury, <i>in vivo</i> , open-chest, LAD occlusion.	dog ♂♀ (mongrel)	I240/R90, Carbocromen for 8 weeks 2 x 20 mg/kg/d p.o., 15 min before occlusion i.v. bolus of 4 mg/kg, 40 µg/kg/min during occlusion and reperfusion.	Carbocromen decreased infarction size, improved coronary collateral blood flow.

(Table 4) contd....

Ref.	Coumarin	Chemical Formula	Pathological State	Experimental Animal	Methods	Results
[90]			Myocardial I/R injury, <i>in vivo</i> , open-chest, LAD occlusion	dog (sex not specified)	i.v. dose of 3 mg/kg.	Carbocromen increased blood flow in normal myocardium, but decreased infarct blood flow and peripheral coronary flow (2-3 h after ligation).
Experimental myocardial injury, haemorrhagic shock						
[91]	marmesinin (linear furano-coumarin, (C19))		Myocardial damage by isoproterenol.	rat ♂	Isoproterenol (ISO) 150 mg/kg i.p. twice at 24 h interval. Two days prior and during ISO administration marmesinin administered in doses 25-400 mg/kg p.o.	Marmesinin at a dose of 200 mg/kg p.o. ameliorated most measured parameters of myocardial damage caused by ISO.
[92]	cloricromen		Haemorrhagic shock.	rat ♂	Blood withdrawal over 20 min until MAP fell to 30 mm Hg. Cloricromen was administered in doses of 0.5, 1.0 and 2 mg/kg i.v. after the end of bleeding. Haemorrhagic shocked rats had enhanced MDF, TXB ₂ and 6-keto PGF _{1α} .	Higher doses of cloricromen increased survival rate, decreased MDF and TXB ₂ and reversed ST segment elevation. In contrast, cloricromen did not affect the production of PGI ₂ .

4-HNE - 4-hydroxynonenal, 6-keto PGF_{1α} - 6-ketoprostaglandin F_{1α}, CAT - catalase, CK - creatine kinase, CK-MB - creatine kinase-MB, GPx - glutathione peroxidase, I/R - ischemic/reperfusion, numerals indicate duration in min, IL-6, IL-10 - interleukines-6/10, LAD - left anterior coronary descending artery, LDH - lactate dehydrogenase, MAP - mean arterial pressure, MDA - malonyldialdehyde, MDF - myocardial depressant factor, MPO - myeloperoxidase, PGI₂ - prostaglandin I₂, SOD - superoxide dismutase, TNF-α - tumour necrosis factor-α, TXB₂ - thromboxane B₂, VPB - ventricular premature beats.

Table 5. Selected pharmacokinetics parameters of vitamin K antagonists [93, 96, 97].

	Warfarin (C27)	Phenprocoumon (C28)	Acenocoumarol (C29)
Chemical formula			
Maintenance dosage (mg/day)	1.5-12	0.75-9	1-9
Volume of distribution (l/kg)	0.08-0.12	0.11-0.14	0.22-0.52
Protein binding	>99%	>99%	>98%
Half-life (h)	36-42	110-130	8-14
Elimination kinetics	first-order	first-order	biphasic

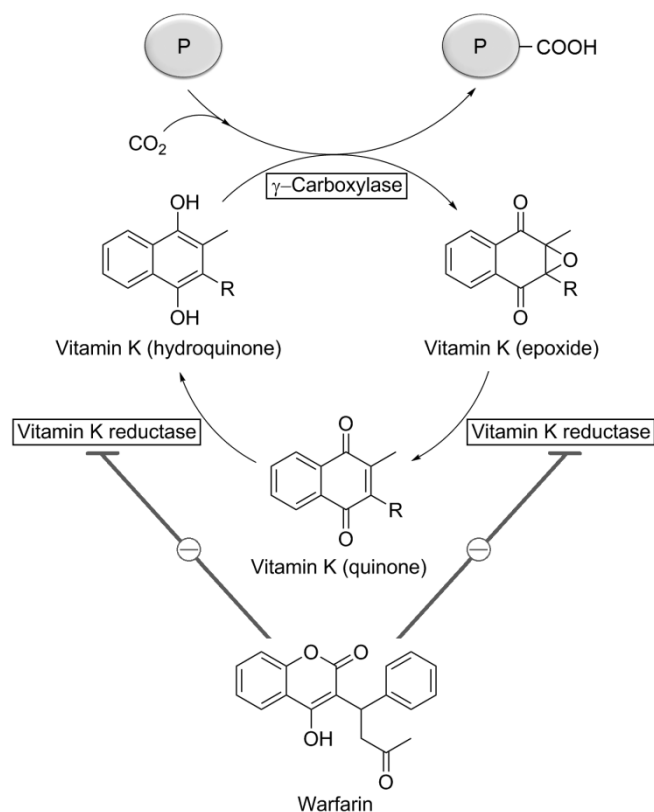


Fig. (4). The mechanism of action of warfarin. Vitamin K participates in the γ -carboxylation of several proteins (P) involved in the coagulation cascade. This carboxylation is responsible for the activation of those factors. The epoxide of vitamin K then has to be regenerated by vitamin K (epoxide) reductase, which might be blocked by warfarin, thus blocking the secondary activation of several coagulation factors (II, VII, IX and X) and some naturally occurring anticoagulation factors, e.g., protein C and protein S.

On the one hand, coumarin derivatives are effective and clinically used anticoagulants, on the other hand therapy with these agents also brings with it significant complications and problems. In general, the major therapeutic problem is the low therapeutic window, which is commonly monitored by International Normalized Ratio (INR). INR is more advantageous than direct drug level monitoring. In particular due to the complicated pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of warfarin, maintaining INR in the range 2-3 is not an easy task, as can be seen from a recent analysis [106-109]. In high INR, bleeding represent the most serious risk of the therapy. According to a meta-analysis of 33 studies for patients who received anticoagulant therapy for more than 3 months, the case-fatality rate of major bleeding was 9.1% (CI, 2.5 % to 21.7 %), and the rate of intracranial bleeding was 0.65 per 100 patient-years (CI, 0.63 to 0.68 per 100 patient-years) [110]. In contrast, a low INR is associated with a higher risk of thromboembolism.

Despite the above-mentioned problems with anticoagulant therapy in clinical practice, coumarin anticoagulants are nowadays widely used, especially in the treatment of atrial fibrillation or for the long-term treatment and prevention of deep venous thrombosis or pulmonary embolism. In particular due to interaction problems and the need to monitor INR, novel oral anticoagulants may replace them in therapy. Such

anticoagulants include direct inhibitors of thrombin and factor Xa, but their structure is not based on the coumarin core and thus they are not the subject of this review [111, 112]. Notwithstanding the clear advantages of those novel drugs, warfarin remains the most frequently used oral anticoagulant worldwide, especially due to its low price and large clinical evidence and experience. The research of novel coumarin anticoagulants has not stopped [113], but due to the advantages of novel anticoagulants, their therapeutic use is questionable.

CHRONIC VENOUS INSUFFICIENCY

Non-substituted coumarin (Table 2 - C9) possesses venoactive properties [114] and has been used for the therapy of chronic venous insufficiency for decades [115]. Its use has been more due to tradition than based on clinical trials. The mode of action of coumarin on venous haemodynamics is complex [116]. A beneficial effect has also been observed when combining coumarin with the flavone troxerutin [116]. Moreover, troxerutin was able to protect the liver from a possible lipid peroxidation caused by coumarin [115].

PHARMACOKINETICS AND TOXICITY

Although the data presented here showed that coumarins, apart from the known effects of warfarin and related anticoagulants, might be very interesting compounds in the treatment of cardiovascular diseases, there is still a long way to go before possible clinical use. Firstly, coumarins which were very active under *in vitro* conditions might not be so promising *in vivo* or in humans. One such example is cloripromen, which failed in clinical settings. The reason is not known, but pharmacokinetics may play a significant role here. Pharmacokinetics is very important for two major reasons in coumarins, firstly, the low bioavailability of the efficient compound may hamper their effect and secondly, the metabolites may be toxic. Last but not least, a possible interaction due to the inhibition of cytochrome P450 3A4 is well known for some furanocoumarins from grapefruit juice, but this is probably not a class effect for coumarins. In addition, there is no clear evidence whether any specific compound is responsible for this effect or if this interaction arises from a cumulative effect of compounds present in this fruit. Among the furanocoumarins thought to be responsible for the inhibition of CYP3A4, paradisins A and B (Fig. 5 - C30 and C31), as well as 6',7'-dihydroxybergamottin (Fig. 5 - 32) and its dimer, are often cited in the literature [117, 118]. Furanocoumarins seem to be particularly important for CYP inhibition, since the CYP2A6 enzyme is inhibited by two other furanocoumarins. The better known one is methoxsalen (Fig. 5 - C33) [119] but recently, the furanocoumarin chalepensisin (Fig. 5 - C34) has been found to be a mechanism-based inhibitor of the same enzyme [120].

A particular problem with coumarins is that the pharmacokinetics have not been determined for the majority of them, or the results are ambiguous. The most available data are on the non-substituted basic coumarin. The coumarin molecule itself can be hydroxylated at all the positions in which such a reaction is possible, namely at positions 3, 4, 5, 6, 7 and 8. All such reactions were found in different species

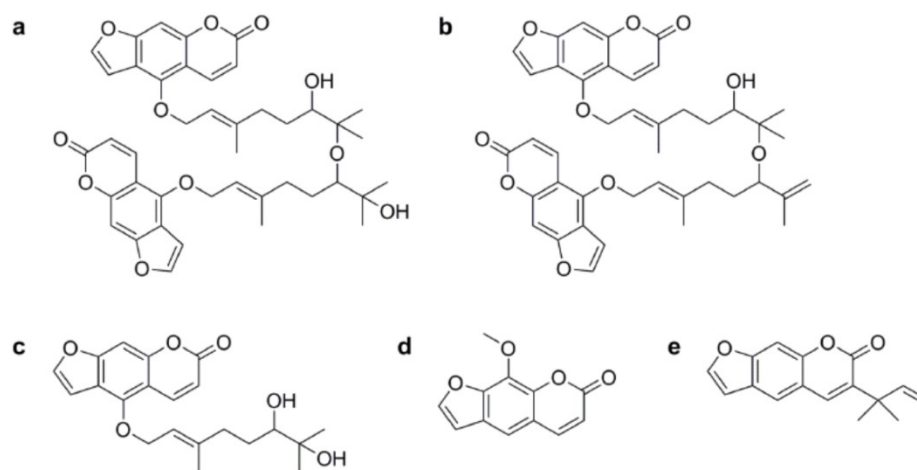


Fig. (5). Chemical structures of suggested inhibitors of CYP3A4. **a:** paradisin A (C30), **b:** paradisin B (C31), **c:** 6',7'-dihydroxybergamottin (C32), **d:** methoxsalen (C33), **e:** chalepensis (C34).

and to a different extent [121]. However, in all the species and samples of various tissues, two pathways were described as the major ones, namely, 7-hydroxylation and formation of the 3,4-epoxide. 7-Hydroxylation is the major pathway in humans (about 75%), catalyzed by CYP2A6. This reaction is commonly understood to be a detoxication. Formation of the 3,4-epoxide is achieved with help of other cytochromes P450, of the CYP1A1, CYP1A2 and CYP2E1 enzymes with the last one being the most important [121]. In rats, the situation is reversed with epoxidation being the major and 7-hydroxylation the minor pathway of coumarin metabolism [121, 122]. However, the coumarin 3,4-epoxide is unstable. It may be either conjugated with glutathione (this detoxication reaction is catalysed by glutathione S-transferase, forms α - or μ -, but not π - [123]) or, converted further to o-hydroxyphenyl acetaldehyde. During this reaction, carbon dioxide is lost and the o-hydroxyphenyl acetaldehyde, which is considered to be the hepatotoxic intermediate, is formed [4, 13, 121-125]. This compound may be detoxified by reduction to o-hydroxyphenyl ethanol or oxidation to o-hydroxyphenylacetic acid [4, 123-125]. Interestingly, it has been concluded that even in humans with a complete lack of 7-hydroxylation, the chance of forming the hepatotoxic o-hydroxyphenyl acetaldehyde is lower than in rats when exposed to a similar dose relative to body weight [125].

CONCLUSION

In addition to their known antioxidant effects, many coumarins possess direct antiplatelet and vasorelaxant properties which are not associated with their interaction on the level of reactive oxygen and nitrogen species. Antiplatelet effects are based on various mechanisms depending on the structure of a coumarin. In contrast, their vasorelaxant properties are based mainly on inhibition of Ca-entry inside vascular smooth muscles cells. However, due to the lack of pharmacokinetic studies, the path to their possible use in clinical practice is very long with unpredictable outcomes.

LIST OF ABBREVIATIONS

AA = arachidonic acid
PAF = platelet-activating factor

ROCC = receptor-operated calcium channels

VDCC = voltage-dependent calcium channels

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grant of the Czech Science Foundation project No. P303/12/G163. I.N. and M.Ř. would like to thank Charles University (SVV 260 064).

REFERENCES

- Wu, L.; Wang, X.; Xu, W.; Farzaneh, F.; Xu, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16*(32), 4236-4260.
- Borges, F.; Roleira, F.; Milhazes, N.; Santana, L.; Uriarte, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*(8), 887-916.
- Hoult, J.R.; Paya, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.*, **1996**, *27*(4), 713-722.
- Lake, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.*, **1999**, *37*(4), 423-453.
- Rasool, M.A.; Khan, R.; Malik, A.; Bibi, N.; Kazmi, S.U. Structural determination of daphnecin, a new coumarinolignan from *Daphne mucronata*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2010**, *12*(4), 324-327.
- Hrdina, R.; Grossmann, V.; Nemeitová, M. [Sensitivity of biochemical indicators and the BSP-test in toxic liver damage by aflatoxin B1]. *Cas. Lek. Cesk.*, **1983**, *122*(30-31), 950-952 (article in Czech).
- Wang, S.F.; Yin, Y.; Qiao, F.; Wu, X.; Sha, S.; Zhang, L.; Zhu, H.L. Synthesis, molecular docking and biological evaluation of metronidazole derivatives containing piperazine skeleton as potential antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *22*(8), 2409-2415.
- Piller, N.B. A comparison of the effectiveness of some anti-inflammatory drugs on thermal oedema. *Br. J. Exp. Pathol.*, **1975**, *56*(6), 554-560.
- Musa, M.A.; Cooperwood, J.S.; Khan, M.O. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*(26), 2664-2679.
- Spino, C.; Dodier, M.; Sotheeswaran, S. Anti-HIV coumarins from *Calophyllum* seed oil. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*(24), 3475-3478.

- [11] Basile, A.; Sorbo, S.; Spadaro, V.; Bruno, M.; Maggio, A.; Faraone, N.; Rosselli, S. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Coumarins from the Roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules*, **2009**, *14*(3), 939-952.
- [12] Venugopala, K.N.; Rashmi, V.; Odhav, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed research international*, **2013**, *2013*, 963248.
- [13] Abraham, K.; Wohrlin, F.; Lindtner, O.; Heinemeyer, G.; Lampen, A. Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, *54*(2), 228-239.
- [14] Mladenka, P.; Zatloukalova, L.; Filipovsky, T.; Hrdina, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.*, **2010**, *49*(6), 963-975.
- [15] Mladěnka, P.; Macáková, K.; Zatloukalová, L.; Řeháková, Z.; Singh, B.K.; Prasad, A.K.; Parmar, V.S.; Jahodář, L.; Hrdina, R.; Saso, L. *In vitro* interactions of coumarins with iron. *Biochimie*, **2010**, *92*(9), 1108-1114.
- [16] Kostova, I.; Bhatia, S.; Grigorov, P.; Balkansky, S.; Parmar, V.S.; Prasad, A.K.; Saso, L. Coumarins as antioxidants. *Curr. Med. Chem.*, **2011**, *18*(25), 3929-3951.
- [17] Lin, H.; Tsai, S.; Chen, C.; Chang, Y.; Lee, C.; Lai, Z.; Lin, C. Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochem. Pharmacol.*, **2008**, *75*(6), 1416-1425.
- [18] He, J.Y.; Zhang, W.; He, L.C.; Cao, Y.X. Imperatorin induces vasodilatation possibly via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated Ca²⁺ influx and release. *Eur. J. Pharmacol.*, **2007**, *573*(1-3), 170-175.
- [19] Zhang, Y.; Wang, Q.L.; Zhan, Y.Z.; Duan, H.J.; Cao, Y.J.; He, L.C. Role of store-operated calcium entry in imperatorin-induced vasodilatation of rat small mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.*, **2010**, *647*(1-3), 126-131.
- [20] Zhang, Y.; Cao, Y.; Wang, Q.; Zheng, L.; Zhang, J.; He, L. A potential calcium antagonist and its antihypertensive effects. *Fitterapia*, **2011**, *82*(7), 988-996.
- [21] Oliveira, E.J.; Romero, M.A.; Silva, M.S.; Silva, B.A.; Medeiros, I.A. Intracellular calcium mobilization as a target for the spasmolytic action of scopoletin. *Planta Med.*, **2001**, *67*(7), 605-608.
- [22] Nie, H.; Meng, L.Z.; Zhou, J.Y.; Fan, X.F.; Luo, Y.; Zhang, G.W. Imperatorin is responsible for the vasodilatation activity of *Angelica Dahurica* var. *Formosana* regulated by nitric oxide in an endothelium-dependent manner. *Chin. J. Integr. Med.*, **2009**, *15*(6), 442-447.
- [23] Wenjie, W.; Houqing, L.; Liming, S.; Ping, Z.; Gengyun, S. Effects of praeuropterin C on blood pressure and expression of phospholamban in spontaneously hypertensive rats. *Phytomedicine*, **2014**, *21*(3), 195-198.
- [24] Zhao, N.C.; Jin, W.B.; Zhang, X.H.; Guan, F.L.; Sun, Y.B.; Adachi, H.; Okuyama, T. Relaxant effects of pyranocoumarin compounds isolated from a Chinese medicinal plant, Bai-Hua Qian-Hu, on isolated rabbit tracheas and pulmonary arteries. *Biol. Pharm. Bull.*, **1999**, *22*(9), 984-987.
- [25] Lee, J.W.; Roh, T.C.; Rho, M.C.; Kim, Y.K.; Lee, H.S. Mechanisms of relaxant action of a pyranocoumarin from *Peucedanum japonicum* in isolated rat thoracic aorta. *Planta Med.*, **2002**, *68*(10), 891-895.
- [26] Yamahara, J.; Kobayashi, G.; Matsuda, H.; Katayama, T.; Fujimura, H. Vascular dilatory action of *Artemisia capillaris* bud extracts and their active constituent. *J. Ethnopharmacol.*, **1989**, *26*(2), 129-136.
- [27] Bertin, R.; Chen, Z.; Martinez-Vazquez, M.; Garcia-Argaez, A.; Frolidi, G. Vasodilation and radical-scavenging activity of imperatorin and selected coumarinic and flavonoid compounds from genus *Casimiroa*. *Phytomedicine*, **2014**, *21*(5), 586-594.
- [28] Li, N.; He, J.; Zhan, Y.; Zhou, N.; Zhang, J. Design, synthesis and preliminary evaluation of novel imperatorin derivatives as vasorelaxant agents. *Med. Chem.*, **2011**, *7*(1), 18-23.
- [29] Yamahara, J.; Kobayashi, G.; Matsuda, H.; Iwamoto, M.; Fujimura, H. Vascular dilatory action of the Chinese crude drug. II. Effects of scoparone on calcium mobilization. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1989**, *37*(2), 485-489.
- [30] Xu, Z.; Wang, X.; Dai, Y.; Kong, L.; Wang, F.; Xu, H.; Lu, D.; Song, J.; Hou, Z. (+/-)-Praeuropterin A enantiomers exert distinct relaxant effects on isolated rat aorta rings dependent on endothelium and nitric oxide synthesis. *Chem. Biol. Interact.*, **2010**, *186*(2), 239-246.
- [31] Yao, L.; Lu, P.; Li, Y.; Yang, L.; Feng, H.; Huang, Y.; Zhang, D.; Chen, J.; Zhu, D. Osthole relaxes pulmonary arteries through endothelial phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-eNOS-NO signaling pathway in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **2013**, *699*(1-3), 23-32.
- [32] Baccard, N.; Mechiche, H.; Nazeyrollas, P.; Manot, L.; Lamiable, D.; Devillier, P.; Millart, H. Effects of 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) on isolated perfused and ischemic-reperfused rat heart. *Arzneimittelforschung*, **2000**, *50*(10), 890-896.
- [33] Chang, T.H.; Adachi, H.; Mori, N.; Saito, I.; Okuyama, T. Effects of a pyranocoumarin compound isolated from a Chinese medicinal plant on ischemic myocardial dysfunction in anesthetized dogs. *Eur. J. Pharmacol.*, **1994**, *258*(1-2), 77-84.
- [34] Ogawa, H.; Sasai, N.; Kamisako, T.; Baba, K. Effects of osthole on blood pressure and lipid metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *112*(1), 26-31.
- [35] Zhou, F.; Zhong, W.; Xue, J.; Gu, Z.L.; Xie, M.L. Reduction of rat cardiac hypertrophy by osthole is related to regulation of cardiac oxidative stress and lipid metabolism. *Lipids*, **2012**, *47*(10), 987-994.
- [36] Gilani, A.H.; Shaheen, E.; Saeed, S.A.; Bibi, S.; Irfanullah; Sadiq, M.; Faizi, S. Hypotensive action of coumarin glycosides from *Daucus carota*. *Phytomedicine*, **2000**, *7*(5), 423-426.
- [37] Campos-Toimil, M.; Orallo, F.; Santana, L.; Uriarte, E. Synthesis and vasorelaxant activity of new coumarin and furocoumarin derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*(5), 783-786.
- [38] Aporti, F.; Finesso, M.; Granata, L. Effects of 8-monochloro-3-beta-diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxycarbonylmethoxy coumarin (AD6) on the coronary circulation in the dog. *Pharmacol. Res. Commun.*, **1978**, *10*(5), 469-477.
- [39] Amin, K.M.; Awadalla, F.M.; Eissa, A.A.; Abou-Seri, S.M.; Hassan, G.S. Design, synthesis and vasorelaxant evaluation of novel coumarin-pyrimidine hybrids. *Biorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*(20), 6087-6097.
- [40] Valenti, P.; Rampa, A.; Budriesi, R.; Bisi, A.; Chiarini, A. Coumarin 1,4-dihydropyridine derivatives. *Biorg. Med. Chem.*, **1998**, *6*(6), 803-810.
- [41] Vilar, S.; Quezada, E.; Santana, L.; Uriarte, E.; Yanez, M.; Fraiz, N.; Alcaide, C.; Cano, E.; Orallo, F. Design, synthesis, and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of coumarin-resveratrol hybrids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*(2), 257-261.
- [42] Quezada, E.; Delogu, G.; Picciau, C.; Santana, L.; Podda, G.; Borges, F.; Garcia-Morales, V.; Vina, D.; Orallo, F. Synthesis and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of a new series of 6-halo-3-phenylcoumarins. *Molecules*, **2010**, *15*(1), 270-279.
- [43] Kim, S.Y.; Koo, Y.K.; Koo, J.Y.; Ngoc, T.M.; Kang, S.S.; Bae, K.; Kim, Y.S.; Yun-Choi, H.S. Platelet anti-aggregation activities of compounds from *Cinnamomum cassia*. *J. Med. Food*, **2010**, *13*(5), 1069-1074.
- [44] Chen, Y.; Wang, T.; Lee, K.; Tzeng, C.; Chang, Y.; Teng, C. Synthesis of Coumarin Derivatives as Inhibitors of Platelet Aggregation. *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*(3), 651-657.
- [45] Prosdoci, M.; Zatta, A.; Gorio, A.; Zanetti, A.; Dejana, E. Action of AD6 (8-monochloro-3-beta-diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxycarbonylmethoxy coumarin) on human platelets *in vitro*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **1986**, *332*(3), 305-310.
- [46] Teng, C.M.; Li, H.L.; Wu, T.S.; Huang, S.C.; Huang, T.F. Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. *Thromb. Res.*, **1992**, *66*(5), 549-557.
- [47] Macakova, K.; Rehakova, Z.; Mladenka, P.; Karlickova, J.; Filipovsky, T.; Riha, M.; Prasad, A.K.; Parmar, V.S.; Jahodář, L.; Pavěk, P.; Hrdina, R.; Saso, L. *In vitro* platelet antiaggregatory properties of 4-methylcoumarins. *Biochimie*, **2012**, *94*(12), 2681-2686.
- [48] Fonseca, F.V.; Baldissera, L., Jr.; Camargo, E.A.; Antunes, E.; Diz-Filho, E.B.; Correa, A.G.; Beriam, L.O.; Toyama, D.O.; Cotrim, C.A.; Alvin, J., Jr.; Toyama, M.H. Effect of the synthetic coumarin, ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate, on activity of Crotalus durissus ruruima sPLA2 as well as on edema and platelet aggregation induced by this factor. *Toxicol.*, **2010**, *55*(8), 1527-1530.
- [49] Hsiao, G.; Ko, F.N.; Jong, T.T.; Teng, C.M. Antiplatelet action of 3',4'-diisovalerylhellactone diester purified from *Peucedanum japonicum* Thunb. *Biol. Pharm. Bull.*, **1998**, *21*(7), 688-692.

- [50] Chen, Y.L.; Wang, T.C.; Liang, S.C.; Teng, C.M.; Tzeng, C.C. Synthesis and evaluation of coumarin alpha-methylene-gamma-butyrolactones: a new class of platelet aggregation inhibitors. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1996**, *44*(8), 1591-1595.
- [51] Wang, T.; Chen, Y.; Tzeng, C.; Liou, S.; Chang, Y.; Teng, C. Anti-platelet α -Methylidene- γ -butyrolactones: Synthesis and evaluation of quinoline, flavone, and xanthone derivatives. *Helv. Chim. Acta*, **1996**, *79*(6), 1620-1626.
- [52] Tzeng, C.; Zhao, Y.; Chen, Y. Synthesis and evaluation of α -methylidene- γ -butyrolactone bearing flavone and xanthone moieties. *Phytochemistry*, **1997**, *80*, 2337-2344.
- [53] Chen, I.S.; Lin, Y.C.; Tsai, I.L.; Teng, C.M.; Ko, F.N.; Ishikawa, T.; Ishii, H. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry*, **1995**, *39*(5), 1091-1097.
- [54] Cerri, R.; Pintore, G.; Dessi, G.; Asproni, B.; Piseddu, G.; Sini, S. Isolation, characterization and pharmacological activity of *Magydaris pastinacea* (Lam) Paol. glucosides. *Farmaco*, **1995**, *50*(12), 841-848.
- [55] Tsai, I.L.; Wun, M.F.; Teng, C.M.; Ishikawa, T.; Chen, I.S. Anti-platelet aggregation constituents from Formosan *Toddalia asiatica*. *Phytochemistry*, **1998**, *48*(8), 1377-1382.
- [56] Chen, K.S.; Wu, C.C.; Chang, F.R.; Chia, Y.C.; Chiang, M.Y.; Wang, W.Y.; Wu, Y.C. Bioactive coumarins from the leaves of *Murraya omphalocarpa*. *Planta Med.*, **2003**, *69*(7), 654-657.
- [57] Chia, Y.C.; Chang, F.R.; Wang, J.C.; Wu, C.C.; Chiang, M.Y.; Lan, Y.H.; Chen, K.S.; Wu, Y.C. Antiplatelet aggregation coumarins from the leaves of *Murraya omphalocarpa*. *Molecules*, **2008**, *13*(1), 122-128.
- [58] Roma, G.; Braccio, M.D.; Carrieri, A.; Grossi, G.; Leoncini, G.; Grazia Signorello, M.; Carotti, A. Coumarin, chromone, and 4(3H)-pyrimidinone novel bicyclic and tricyclic derivatives as antiplatelet agents: synthesis, biological evaluation, and comparative molecular field analysis. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*(1), 123-138.
- [59] Roma, G.; Di Braccio, M.; Grossi, G.; Piras, D.; Leoncini, G.; Bruzzese, D.; Signorello, M.G.; Fossa, P.; Mosti, L. Synthesis and *in vitro* antiplatelet activity of new 4-(1-piperaziny)coumarin derivatives. Human platelet phosphodiesterase 3 inhibitory properties of the two most effective compounds described and molecular modeling study on their interactions with phosphodiesterase 3A catalytic site. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*(12), 2886-2895.
- [60] Di Braccio, M.; Grossi, G.; Roma, G.; Grazia Signorello, M.; Leoncini, G. Synthesis and *in vitro* inhibitory activity on human platelet aggregation of novel properly substituted 4-(1-piperaziny)coumarins. *Eur. J. Med. Chem.*, **2004**, *39*(5), 397-409.
- [61] Leoncini, G. Mechanisms involved in the antiplatelet activity of 8-methyl-4-(1-piperaziny)-7-(3-pyridinylmethoxy)-2H-1-benzopyran-2-one (RC414). *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *67*(5), 911-918.
- [62] Luzzatto, G.; Fabris, F.; Dal Bo Zanon, R.; Girolami, A. Lack of antiplatelet activity of the new coumarin derivative 8-monochloro-3-beta-diethylaminoethyl-4-methyl-7-ethoxy-carboxylmethoxy-coumarin under *in vivo* conditions in man. *Arzneimittel-Forschung*, **1986**, *36*(6), 972-973.
- [63] Xiao, W.L.; Li, S.H.; Shen, Y.H.; Niu, X.M.; Sun, H.D. Two new coumarin glucosides from the roots of *Angelica apensis* and their anti-platelet aggregation activity. *Arch. Pharm. Res.*, **2007**, *30*(7), 799-802.
- [64] Matano, Y.; Okuyama, T.; Shibata, S.; Hoson, M.; Kawada, T.; Osada, H.; Noguchi, T. Studies on coumarins of a Chinese drug "qian-hu"; VII. Structures of new coumarin-glycosides of zi-hua qian-hu and effect of coumarin-glycosides on human platelet aggregation. *Planta Med.*, **1986**(2), 135-138.
- [65] Niu, X.M.; Li, S.H.; Wu, L.X.; Li, L.; Gao, L.H.; Sun, H.D. Two new coumarin derivatives from the roots of *Heracleum rapula*. *Planta Med.*, **2004**, *70*(6), 578-581.
- [66] Bruno, O.; Brullo, C.; Schenone, S.; Bondavalli, F.; Ranise, A.; Tognolini, M.; Impicciatore, M.; Ballabeni, V.; Barocelli, E. Synthesis, antiplatelet and antithrombotic activities of new 2-substituted benzopyrano[4,3-d]pyrimidin-4-cycloamines and 4-amino-cycloamino-benzopyrano[4,3-d]pyrimidin-5-ones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *14*(1), 121-130.
- [67] Cepelakova, H.; Roubal, Z.; Grimova, J.; Dlabac, A.; Cepelak, V. Effect of pyrazolidine and coumarin derivatives on bleeding time and prothrombin level in rats. *Acta Universitatis Carolinae. Medica. Monographia*, **1972**, *52*, 55-60.
- [68] Toyama, D.O.; Marangoni, S.; Diz-Filho, E.B.; Oliveira, S.C.; Toyama, M.H. Effect of umbelliferone (7-hydroxycoumarin, 7-HOC) on the enzymatic, edematogenic and necrotic activities of secretory phospholipase A2 (sPLA2) isolated from *Crotalus durissus collilineatus* venom. *Toxicon*, **2009**, *53*(4), 417-426.
- [69] Ribaldi, E.; Mezzasoma, A.M.; Francescangeli, E.; Prosdoci, M.; Nenci, G.G.; Goracci, G.; Gresele, P. Inhibition of PAF synthesis by stimulated human polymorphonuclear leucocytes with cloricromene, an inhibitor of phospholipase A2 activation. *British J. Pharmacol.*, **1996**, *118*(6), 1351-1358.
- [70] Porcellati, S.; Costantini, V.; Prosdoci, M.; Stasi, M.; Pistolesi, R.; Nenci, G.G.; Goracci, G. The coumarin derivative AD6 inhibits the release of arachidonic acid by interfering with phospholipase A2 activity in human platelets stimulated with thrombin. *Agents Actions*, **1990**, *29*(3-4), 364-373.
- [71] Stasi, M.; Gresele, P.; Prosdoci, M.; Porcellati, S.; Quero, E.; Pieretti, G.; Nenci, G.G.; Goracci, G. Cloricromene inhibits G-protein-mediated activation of phospholipase A2 in human platelets. *J. Lipid Mediat.*, **1993**, *7*(3), 253-267.
- [72] Lidbury, P.S.; Cirillo, R.; Vane, J.R. Dissociation of the anti-ischaemic effects of cloricromene from its anti-platelet activity. *British J. Pharmacol.*, **1993**, *110*(1), 275-280.
- [73] Jackson, S.P. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, **2007**, *109*(12), 5087-5095.
- [74] Corsini, E.; Lucchi, L.; Binaglia, M.; Viviani, B.; Bevilacqua, C.; Monasta, G.; Marinovich, M.; Galli, C.L. Cloricromene, a semi-synthetic coumarin derivative, inhibits tumor necrosis factor-alpha production at a pre-transcriptional level. *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, *418*(3), 231-237.
- [75] Bucolo, C.; Ward, K.W.; Mazzon, E.; Cuzzocrea, S.; Drago, F. Protective effects of a coumarin derivative in diabetic rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **2009**, *50*(8), 3846-3852.
- [76] Mariot, R.; Zangirrolami, L.; Bellato, P.; Chen, S.; Pieraccini, G.; Moneti, G. Determination of the coumarin derivative cloricromene acid in rabbit plasma and platelets. *J. Chromatogr.*, **1992**, *576*(1), 143-148.
- [77] Gresele, P.; Migliacci, R.; Di Sante, G.; Nenci, G.G.; Group, C.I. Effect of cloricromene on intermittent claudication. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in patients treated with aspirin: effect on claudication distance and quality of life. CRAMPS Investigator Group. Cloricromene Randomized Arteriopathy Multi-center Prospective Study. *Vasc. Med.*, **2000**, *5*(2), 83-89.
- [78] Jain, M.; Surin, W.R.; Misra, A.; Prakash, P.; Singh, V.; Khanna, V.; Kumar, S.; Siddiqui, H.H.; Raj, K.; Barthwal, M.K.; Dikshit, M. Antithrombotic activity of a newly synthesized coumarin derivative 3-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-chroman-6-yl)-N-{2-[3-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-chroman-6-yl)-propionylamino]-ethyl} -propionamide. *Chem. Biol. Drug Des.*, **2013**, *81*(4), 499-508.
- [79] Sibbing, D.; von Beckerath, N.; Morath, T.; Stegherr, J.; Mehilli, J.; Sarafoff, N.; Braun, S.; Schulz, S.; Schomig, A.; Kastrati, A. Oral anticoagulation with coumarin derivatives and antiplatelet effects of clopidogrel. *Eur. Heart J.*, **2010**, *31*(10), 1205-1211.
- [80] Poller, L.; Thomson, J.M.; Priest, C.M. Coumarin therapy and platelet aggregation. *Br. Med. J.*, **1969**, *1*(5642), 474-476.
- [81] Ojewole, J.A.; Adesina, S.K. Cardiovascular and neuromuscular actions of scopoletin from fruit of *Tetrapleura tetraptera*. *Planta Med.*, **1983**, *49*(2), 99-102.
- [82] Bertolino, M.; Prosdoci, M.; Aporti, F.; Finesso, M.; Gorio, A. The action of AD6 on experimental arrhythmias and on action potentials of cardiac fibers. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **1986**, *281*(1), 66-78.
- [83] Du, G.Y.; Ye, W.H.; Lu, F.; Jing, H.D. Effects of 6,7-dimethoxycoumarin on experimental arrhythmia. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica*, **1993**, *14* Suppl, S16-18.
- [84] Nakayama, K.; Oshima, T.; Koike, H. Antiarrhythmic activity of dextro- and levo-isomers of 5-methyl-8-(2-hydroxy-3-*t*-butylamino-propoxy) coumarin hydrochloride (bucumolol), a beta-adrenergic blocking agent, on aconitine-induced atrial and abeta-adenine-induced ventricular arrhythmias in dogs. *Jpn. J. Pharmacol.*, **1979**, *29*(6), 935-945.
- [85] Sirbulescu, R.; Scholtholt, J.; Nitz, R.E.; Kunath, B. [The effect of carbocromen on the ST segment of the epicardial electrocardio-

- gram in a model of intermitting myocardial ischemia (author's transl). *Arzneimittel-Forschung*, **1976**, *26*(2), 204-208.
- [86] Milei, J.; Ferreira, R.; Grana, D.; Beigelman, R.; Cirillo, R. Beneficial effects of cloricromene in ischemic reperfused myocardium. *Cardiology*, **1994**, *84*(4-5), 284-291.
- [87] Lidbury, P.S.; Cirillo, R.; Vane, J.R. Dissociation of the anti-ischaemic effects of cloricromene from its anti-platelet activity. *Br. J. Pharmacol.*, **1993**, *110*(1), 275-280.
- [88] Wang, X.Y.; Dong, W.P.; Bi, S.H.; Pan, Z.G.; Yu, H.; Wang, X.W.; Ma, T.; Wang, J.; Zhang, W.D. Protective effects of osthole against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Int. J. Mol. Med.*, **2013**, *32*(2), 365-372.
- [89] Fiedler, V.B.; Nitz, R.E.; Buchheim, S. Effects of oral carbocromene pretreatment on infarct size following experimental coronary artery occlusion. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1982**, *4*(1), 14-25.
- [90] Ledingham, I.M.; McArdle, C.S.; Parratt, J.R. Proceedings: Comparison of a coronary vasodilator drug (carbochromen) and a cardiac stimulant (oxyfedrin) on blood flow and oxygen extraction in experimental myocardial infarcts. *Brit. J. Pharmacol.*, **1972**, *44*(2), 323p-324p.
- [91] Vimal, V.; Devaki, T. Linear furanocoumarin protects rat myocardium against lipidperoxidation and membrane damage during experimental myocardial injury. *Biomed. Pharmacother.*, **2004**, *58*(6-7), 393-400.
- [92] Sturmiolo, R.; Squadrito, F.; Campo, G.M.; Vinci, R.; Calatroni, A.; Prosdociami, M.; Caputi, A.P. Protective effect of cloricromene, a coumarine derivative, in hypovolemic hemorrhagic shock in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1991**, *17*(2), 261-266.
- [93] van Leeuwen, Y.; Rosendaal, F.R.; van der Meer, F.J. The relationship between maintenance dosages of three vitamin K antagonists: acenocoumarol, warfarin and phenprocoumon. *Thromb. Res.*, **2008**, *123*(2), 225-230.
- [94] Pirmohamed, M. Warfarin: almost 60 years old and still causing problems. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2006**, *62*(5), 509-511.
- [95] Eriksson, N.; Wadelius, M. Prediction of warfarin dose: why, when and how? *Pharmacogenomics*, **2012**, *13*(4), 429-440.
- [96] van Schie, R.M.; Wessels, J.A.; le Cessie, S.; de Boer, A.; Schalekamp, T.; van der Meer, F.J.; Verhoef, T.I.; van Meegen, E.; Rosendaal, F.R.; Maitland-van der Zee, A.H. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur. Heart J.*, **2011**, *32*(15), 1909-1917.
- [97] Ufer, M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin. Pharmacokinetics*, **2005**, *44*(12), 1227-1246.
- [98] Hirsh, J.; Fuster, V.; Ansell, J.; Halperin, J.L. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *Circulation*, **2003**, *107*(12), 1692-1711.
- [99] Baczek, V.L.; Chen, W.T.; Kluger, J.; Coleman, C.I. Predictors of warfarin use in atrial fibrillation in the United States: a systematic review and meta-analysis. *BMC Fam. Pract.*, **2012**, *13*, 5.
- [100] Assiri, A.; Al-Majzoub, O.; Kanaan, A.O.; Donovan, J.L.; Silva, M. Mixed treatment comparison meta-analysis of aspirin, warfarin, and new anticoagulants for stroke prevention in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Clin. Ther.*, **2013**, *35*(7), 967-984.e962.
- [101] Andersen, L.V.; Vestergaard, P.; Deichgraeber, P.; Lindholt, J.S.; Mortensen, L.S.; Frost, L. Warfarin for the Prevention of Systemic Embolism in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation: A Meta-analysis. *Heart*, **2008**.
- [102] Hart, R.G.; Pearce, L.A.; Aguilar, M.I. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann. Intern. Med.*, **2007**, *146*(12), 857-867.
- [103] Mant, J.; Hobbs, F.D.; Fletcher, K.; Roalfe, A.; Fitzmaurice, D.; Lip, G.Y.; Murray, E. Warfarin versus aspirin for stroke prevention in an elderly community population with atrial fibrillation (the Birmingham Atrial Fibrillation Treatment of the Aged Study, BAFTA): a randomised controlled trial. *Lancet*, **2007**, *370*(9586), 493-503.
- [104] Segal, J.B.; McNamara, R.L.; Miller, M.R.; Kim, N.; Goodman, S.N.; Powe, N.R.; Robinson, K.A.; Bass, E.B. Prevention of thromboembolism in atrial fibrillation. A meta-analysis of trials of anticoagulants and antiplatelet drugs. *J. Gen. Intern. Med.*, **2000**, *15*(1), 56-67.
- [105] Anand, S.S.; Yusuf, S. Oral anticoagulant therapy in patients with coronary artery disease: a meta-analysis. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, **1999**, *282*(21), 2058-2067.
- [106] Keeling, D.; Baglin, T.; Tait, C.; Watson, H.; Perry, D.; Baglin, C.; Kitchen, S.; Makris, M. Guidelines on oral anticoagulation with warfarin - fourth edition. *Br. J. Haematol.*, **2011**, *154*(3), 311-324.
- [107] Boulanger, L.; Kim, J.; Friedman, M.; Hauch, O.; Foster, T.; Menzies, J. Patterns of use of antithrombotic therapy and quality of anticoagulation among patients with non-valvular atrial fibrillation in clinical practice. *Int. J. Clin. Pract.*, **2006**, *60*(3), 258-264.
- [108] Saokaew, S.; Permsuwan, U.; Chaiyakunapruk, N.; Nathisuwan, S.; Sukonthasam, A. Effectiveness of pharmacist-participated warfarin therapy management: a systematic review and meta-analysis. *J. Thromb. Haemost.*, **2010**, *8*(11), 2418-2427.
- [109] Zineh, I.; Pacanowski, M.; Woodcock, J. Pharmacogenetics and Coumarin Dosing - Recalibrating Expectations. *N. Engl. J. Med.*, **2013**, *369*(24), 2273-2275.
- [110] Linkins, L.A.; Choi, P.T.; Douketis, J.D. Clinical impact of bleeding in patients taking oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism: a meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, **2003**, *139*(11), 893-900.
- [111] Ruff, C.T.; Giugliano, R.P.; Braunwald, E.; Hoffman, E.B.; Deenadayalu, N.; Ezekowitz, M.D.; Camm, A.J.; Weitz, J.I.; Lewis, B.S.; Parkhomenko, A.; Yamashita, T.; Antman, E.M. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *Lancet*, **2014**, *383*(9921), 955-962.
- [112] Granger, C.B.; Alexander, J.H.; McMurray, J.J.; Lopes, R.D.; Hylek, E.M.; Hanna, M.; Al-Khalidi, H.R.; Ansell, J.; Atar, D.; Avezum, A.; Bahit, M.C.; Diaz, R.; Easton, J.D.; Ezekowitz, J.A.; Flaker, G.; Garcia, D.; Geraldles, M.; Gersh, B.J.; Golitsyn, S.; Goto, S.; Hermosillo, A.G.; Hohnloser, S.H.; Horowitz, J.; Mohan, P.; Jansky, P.; Lewis, B.S.; Lopez-Sendon, J.L.; Pais, P.; Parkhomenko, A.; Verheugt, F.W.; Zhu, J.; Wallentin, L. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N. Engl. J. Med.*, **2011**, *365*(11), 981-992.
- [113] Abdelhafez, O.M.; Amin, K.M.; Batran, R.Z.; Maher, T.J.; Nada, S.A.; Sethumadhavan, S. Synthesis, anticoagulant and PIVKA-II induced by new 4-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18*(10), 3371-3378.
- [114] Eberhardt, R.T.; Raffetto, J.D. Chronic venous insufficiency. *Circulation*, **2005**, *111*(18), 2398-2409.
- [115] Adam, B.S.; Pentz, R.; Siegers, C.P.; Strubelt, O.; Tegtmeier, M. Troxerutin protects the isolated perfused rat liver from a possible lipid peroxidation by coumarin. *Phytomedicine*, **2005**, *12*(1-2), 52-61.
- [116] Vanscheidt, W.; Rabe, E.; Naser-Hijazi, B.; Ramelet, A.A.; Partsch, H.; Diehm, C.; Schultz-Ehrenburg, U.; Spengel, F.; Wirsching, M.; Gotz, V.; Schnitker, J.; Henneicke-von Zepelin, H.H. The efficacy and safety of a coumarin-troxerutin combination (SB-LOT) in patients with chronic venous insufficiency: a double blind placebo-controlled randomised study. *Vasa*, **2002**, *31*(3), 185-190.
- [117] Oda, K.; Yamaguchi, Y.; Yoshimura, T.; Wada, K.; Nishizono, N. Synthetic models related to furanocoumarin-CYP 3A4 interactions. comparison of furanocoumarin, coumarin, and benzofuran dimers as potent inhibitors of CYP3A4 activity. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **2007**, *55*(9), 1419-1421.
- [118] Schmiedlin-Ren, P.; Edwards, D.J.; Fitzsimmons, M.E.; He, K.; Lown, K.S.; Woster, P.M.; Rahman, A.; Thummel, K.E.; Fisher, J.M.; Hollenberg, P.F.; Watkins, P.B. Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metab. Dispos.*, **1997**, *25*(11), 1228-1233.
- [119] Kharasch, E.D.; Hankins, D.C.; Taraday, J.K. Single-dose methoxsalen effects on human cytochrome P-450 2A6 activity. *Drug Metab. Dispos.*, **2000**, *28*(1), 28-33.
- [120] Ueng, Y.F.; Chen, C.C.; Chung, Y.T.; Liu, T.Y.; Chang, Y.P.; Lo, W.S.; Murayama, N.; Yamazaki, H.; Soucek, P.; Chau, G.Y.; Chi, C.W.; Chen, R.M.; Li, D.T. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 (CYP)2A6 by cholepinin in recombinant systems, in human liver microsomes and in mice *in vivo*. *British J. Pharmacol.*, **2011**, *163*(6), 1250-1262.

- [121] von Weymarn, L.B.; Murphy, S.E. Coumarin metabolism by rat esophageal microsomes and cytochrome P450 2A3. *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, *14*(10), 1386-1392.
- [122] Born, S.L.; Caudill, D.; Fliter, K.L.; Purdon, M.P. Identification of the cytochromes P450 that catalyze coumarin 3,4-epoxidation and 3-hydroxylation. *Drug Metab. Dispos.*, **2002**, *30*(5), 483-487.
- [123] Vassallo, J.D.; Hicks, S.M.; Daston, G.P.; Lehman-McKeeman, L.D. Metabolic Detoxification Determines Species Differences in Coumarin-Induced Hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.*, **2004**, *80*(2), 249-257.
- [124] Felter, S.P.; Vassallo, J.D.; Carlton, B.D.; Daston, G.P. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. *Food Chem. Toxicol.*, **2006**, *44*(4), 462-475.
- [125] Rietjens, I.M.; Punt, A.; Schilter, B.; Scholz, G.; Delatour, T.; van Bladeren, P.J. In silico methods for physiologically based biokinetic models describing bioactivation and detoxification of coumarin and estragole: implications for risk assessment. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, *54*(2), 195-207.

RESEARCH ARTICLE

Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats

Iveta Najmanová¹, Jana Pourová¹, Marie Vopršalová¹, Veronika Pilařová², Vladimír Semecký³, Lucie Nováková² and Přemysl Mladěnka¹

¹ Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic

² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic

³ Department of Biological and Medical Science, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague, Hradec Králové, Czech Republic

Scope: A number of studies have suggested that higher flavonoid intake is associated with lower cardiovascular mortality. The direct vasodilatory potential of flavonoids is one proposed mechanism for this link. However, the bioavailability of flavonoid aglycones is low. The metabolites of flavonoids could therefore explain/contribute to the effect.

Methods and results: We tested a series of quercetin metabolites formed by both human enzymes and colon microflora. *In vitro*, a number of these metabolites resulted in vasodilation of isolated rat aortic rings, precontracted with norepinephrine. However, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid (3HPPA) was clearly the most potent with an effect of about one order better than quercetin or its close methyl derivatives isorhamnetin and tamarixetin. In contrast, quercetin-3-*O*-glucuronide was void of any effect. The vasodilatory activity of 3HPPA was confirmed by *in vivo* experiments on both normotensive and spontaneously hypertensive rats. Subsequent experiments showed that the arterial blood pressure decrease found after 3HPPA was associated with the peripheral action of the compound on vascular beds and was NO-based.

Conclusion: This is the first study showing that a metabolite of flavonoids formed by human microflora has haemodynamic effects.

Keywords:

Blood pressure / Flavonoid / Metabolite / Phenolic / Quercetin / Rat / Vascular

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

1 Introduction

Flavonoids are polyphenolic compounds that are regularly consumed in the human diet as fruits, vegetables, nuts, and derived products like chocolate and wine. Significant effects of flavonoids on vascular smooth muscles have been reported

in vitro and *in vivo* [1, 2]. Clinical studies of their effects on the cardiovascular system usually focus on flavonoid-rich food, e.g. recent reports on blood pressure lowering effects of blueberry and cranberry juice [3, 4] and more extensively documented effects of cocoa products rich in the flavanol epicatechin [5]. Surprisingly, clinical data on the effects of pure flavonoids on arterial blood pressure are generally sparse and positive effects have not always been found [6–8]. There are likely three major reasons for this: (1) lack of interest by pharmaceutical companies due to the impossibility of patenting known flavonoids, (2) small effect or (3) still undefined mechanism of action and the complex pharmacokinetics of flavonoids with consequent difficulties in results

Correspondence: Dr. Přemysl Mladěnka
E-mail: mladenkap@faf.cuni.cz

Abbreviations: 3HPPA, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid; L-NAME, L-N-nitroarginine methyl ester; NE, norepinephrine; SHR, spontaneously hypertensive rats

interpretation and clinical application [9]. In particular, neglecting the pharmacokinetics might be a key factor. This can be illustrated by the fact that a number of studies have reported positive effects of different flavonoid aglycones on vascular smooth muscle *in vitro*. However, testing the pure aglycones does not take into account two important facts: (1) in plasma, the conjugated forms of flavonoids (glucuronides, sulphates etc.) dominate, while the pure aglycones are absent or present only in very low concentrations, and (2) flavonoids are only partially absorbed in the upper gastrointestinal tract. They are largely metabolised in the colon by human microflora into small phenolic acids [10] that are easily absorbed and may thus have some pharmacological effects.

In this study, we chose quercetin as one of the most abundant flavonoids in food. This is the flavonoid mostly analyzed by researchers from a number of viewpoints including vasoactive properties [11]. Quercetin has demonstrated antihypertensive effects in the most common rodent models of hypertension. In addition, it attenuates cardiac hypertrophy, restores impaired endothelial vasodilator function, reduces oxidative stress in hypertensive animals, and protects against pulmonary arterial hypertension [12]. It has been reported that oral quercetin results in improved NO-based vasodilation caused by acetylcholine, a decrease in aorta-reaction to vasoconstrictors, an increase in eNOS activity and a decrease in expression of NADPH oxidase subunits in aortic rings from both spontaneously hypertensive (SHR) and healthy control rats [1, 39, 40]. Interestingly, the NADPH-activity and protein expression of its subunits were decreased in the aortic rings after oral but not after i.p. administered quercetin drawing attention to the impact of metabolites formed in the gastrointestinal tract [1]. The same study also showed that i.p. administration led to lower antihypertensive effects than oral administration even though higher concentrations of quercetin metabolites with preserved flavonoid structure were measured in plasma after i.p. injection [1]. These, at first sight contradictory results are explainable in terms of the metabolites mentioned above which are formed by bacteria in the gastrointestinal tract, and their pharmacodynamic effects. Most orally given quercetin is not absorbed in the upper gastrointestinal tract and reaches the colon, where it yields a number of metabolites. The metabolism of quercetin and its glycosides from human faeces samples or from specific bacteria present in faeces has been investigated in some *in vitro* studies [13–17]. We assumed that these or similar metabolic pathways are also functional *in vivo* (Fig. 1). It is known for example that a half of the oral dose of rutin, quercetin-3-O-rutinoside, is metabolized into phenolic acids [18, 19]. For this reason, these metabolites may participate significantly in quercetin effects and certainly deserve attention. Unfortunately, we still do not know the full spectrum of these compounds and even less about their effects. There are few studies on the small phenolic acids formed in the colon *in vivo* and with their concentrations in human/rat urine, also in plasma [18–20].

The aim of this study was to investigate the paradoxically greater effects of orally provided quercetin compared to intraperitoneal administration by examination of metabolite(s) formed in the gastrointestinal tract that may participate in/be responsible for the antihypertensive effect of quercetin. We hypothesized that small phenolic acids formed in the colon could be crucial. We approached this by first carrying out a series of *in vitro* tests to identify the most effective vasodilatory substance(s), and then verifying its effect *in vivo* on normotensive and spontaneously hypertensive rats. Another goal was to elucidate its mechanism of action. As far as we know, this is the first study to analyse the effect of small phenolic acids (flavonoids metabolites) on vascular smooth muscle and arterial blood pressure. Part of this study has been published as an abstract [21].

2 Materials and methods

2.1 Animals

The experiments were carried out on male normotensive Wistar rats obtained from MediTox (Czech Republic) and on SHR from Charles River (USA). The animals were housed in the Faculty of Pharmacy animal house, maintained at a constant temperature 23–25 °C with 12-h dark/light cycle. They were provided a standard diet and tap water *ad libitum*. The study (reg. No. MSMT-7041/2014-10) was approved by the Experimental Animal Welfare Committee of Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové and conformed to The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

2.2 Chemicals

Norepinephrine (NE), sodium nitroprusside, ascorbic acid, acetylcholine, L-N-nitroarginine methyl ester (L-NAME), atropine and DMSO were purchased from Sigma-Aldrich. Flavonoid and its metabolites: quercetin, 3-phenylpropionic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid, 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid/3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid/, 2-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, 3-hydroxybenzoic acid, phloroglucinol, and 4-methylcatechol were purchased from Sigma-Aldrich (Germany), quercetin-3-O-glucuronide, isorhamnetin, tamarixetin, and 3-coumaric acid from Extrasynthese (France) and 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid (3HPPA) and 3-hydroxyphenylacetic acid from Toronto Research Chemicals (Canada).

2.3 *In vitro*

These experiments were performed on isolated thoracic rat aortas. The rats were anesthetized by urethane 1.2 g/kg and

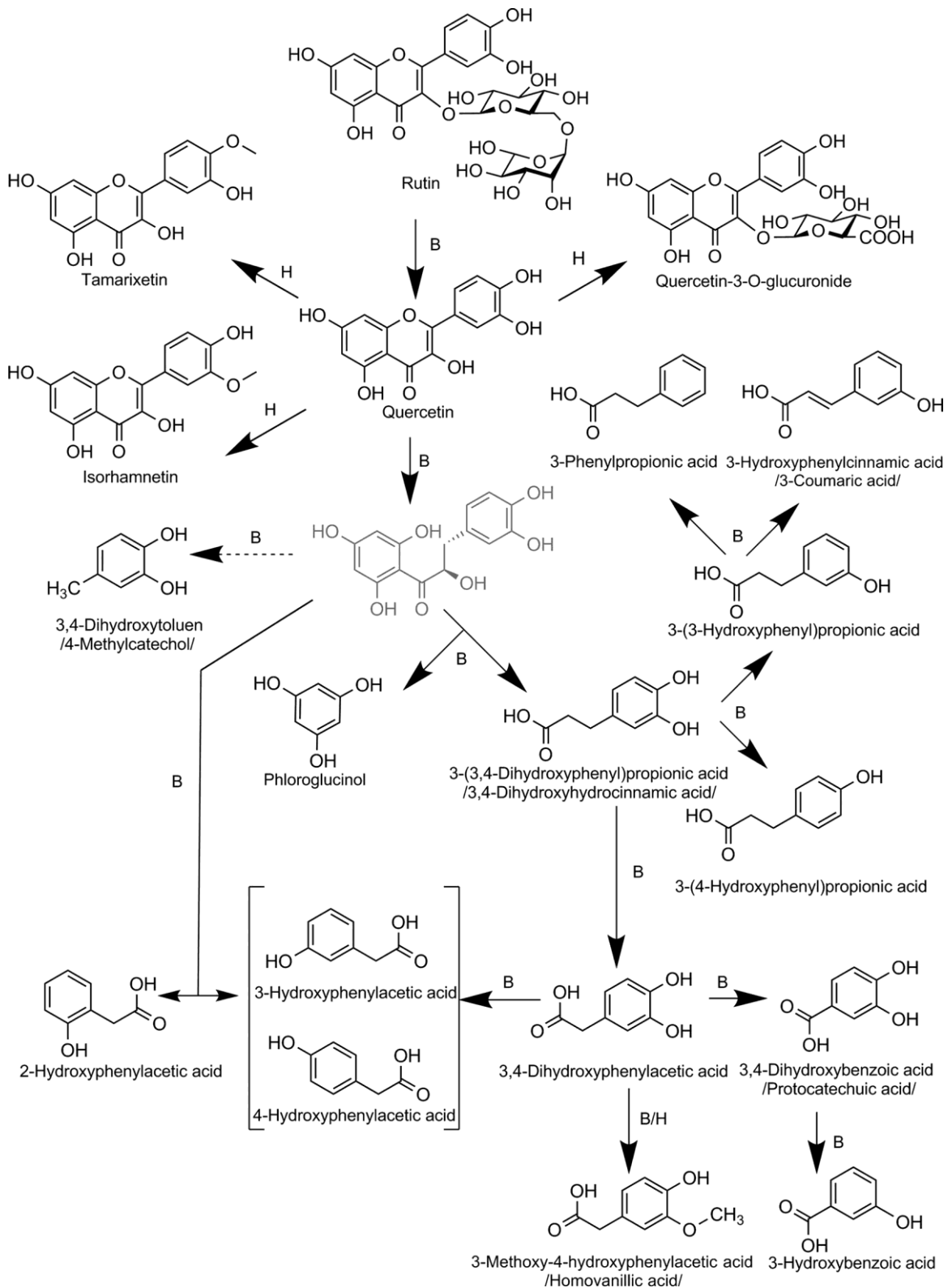


Figure 1. Metabolism of quercetin. This figure shows confirmed and suggested metabolites of quercetin that were tested in this study. Rutin is shown as an example of a quercetin glycoside. The data on phenolic acid metabolites were summarized from the following articles: [13–20]. The structure in gray is a hypothetical intermediate, which has not been detected up to now. B refers to bacterial enzymes (microflora) and H human enzymes.

killed by exsanguination. The thoracic aorta was excised and cleaned of connective tissue and blood and then cut into rings of 3 mm long. In some aortic rings, the endothelial layer (see Supporting Information Fig. 1) was mechanically disrupted by gently rubbing the luminal surface with dental floss. The rings were maintained in tissue baths with Krebs–Henseleit solution (in mM): NaCl 135, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.3, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 20, glucose 10, oxygenated by 95% O₂/5% CO₂ and kept at 37 °C. Contractions were measured by hung up rings between two stainless-steel wire hooks, one of them attached to the end of a fixed support rod and the second was connected with a transducer and computer equipped S.P.E.L. Advanced kymograph Software (Experimetria Ltd, Hungary). The rings were equilibrated at a tension of 2 g for one hour and washed every 20 min. After the stabilization period, the tissue baths were filled with 5 mL of Krebs solution.

To assess the vasorelaxant potency, the aorta rings were contracted by NE (final concentration was 10 μM). After the stabilization of contractions (45 min) acetylcholine (10 μM) was added to confirm intact or denuded endothelium. The tissue baths were then washed, filled with Krebs solution and the NE addition was repeated. Ascorbic acid (10 μM) was added to the tissue baths to avoid degradation of the NE. After the contraction had restabilized, a tested metabolite was added to the bath cumulatively to a final concentrations ranging from 10 nM to 1 mM. The solutions of tested metabolites were prepared in DMSO and the final concentration of DMSO in the bath was generally no higher than 0.1% in the case of efficient metabolites. In experiments with low active metabolites, additional experiments for assessment of EC₅₀ were performed with a concentration of DMSO up to 1–2% due to the low solubility of flavonoids in higher concentrations. The maximal relaxation was provoked by sodium nitroprusside (10 μM).

The mechanisms of action of quercetin and the most active metabolite on vascular smooth muscle were studied on endothelial denuded aortic rings or by the muscarinic receptor blocker - atropine (50 μM) and a NO synthase inhibitor - L-NAME (100 μM) added 30 min before NE addition.

In a separate set of experiments, the left renal artery of the rat was isolated, cleaned, cut into the 2 mm length rings and mounted onto the Small Vessel Wire myograph system (Experimetria Ltd, Hungary). The tissue bath was filled with 5 mL of Krebs solution and maintained under the same conditions as described above. The vessel was under a tension of 1 g and allowed to stabilize. During the 45 min stabilization period, the Krebs solution was changed three times. Following restabilization, the ascorbic acid and NE were added to a final concentration 10 μM in the tissue bath. The stabilization of contraction took around 30 min followed by the addition of cumulative doses of 3HPPA (from 1 nM to 1 mM). The changes in tension were measured and recorded by S.P.E.L. Advanced kymograph Software. The experiment was terminated by inducing maximal relaxation using sodium nitroprusside under the same condition as described above.

2.4 *In vivo*

2.4.1 Blood pressure experiments

Thirteen Wistar rats (average weight 375 g, blood pressure values under anesthesia: 124 ± 26/78 ± 16 mmHg) and six SHR (310 g, 15 weeks old, 184 ± 26/123 ± 21 mmHg) were anesthetized i.p. by urethane 1.2 g/kg (Wistar) or pentobarbital 50 mg/kg (SHR) and the arterial blood pressure and heart rate were recorded using PowerLab equipped with software LabChart 7 (AdInstruments, Australia) via a pressure transducer MLT0380/D linked to the left common iliac artery. The vena saphena sinistra was cannulated and after an acclimatization period of 15 min, saline or 3HPPA dissolved in saline were administered as a bolus or 5-min infusion. The doses were as follows: single bolus ranging from 0.2 to 25 mg/kg and 5-min infusion rates from 0.25 mg of 3HPPA per kg in 50 μL of saline per min to 5 mg/kg/50 μL/min using of the “Genie” Kent syringe pump (Kent Scientific Corporation, USA). In a separate set of experiments, each saline or 3HPPA solution was followed 5 min later by injections of 100 ng/kg and 500 ng/kg of NE in saline into the vena jugularis dexter. The experiment was terminated by 1 mL of 1 M KCl. The body temperature was maintained during the whole experiment at 36.5 ± 0.5 °C.

2.4.2 Heart hemodynamic experiments

The experiments were similar to the foregoing but extended by introduction of a pressure-volume catheter inserted in the left ventricle. Shortly, additional five male Wistar rats (weighing around 300 g) were anesthetized with urethane and connected with a pressure transducer via left common iliac artery. The Millar pressure-volume-catheter SPR-838 2F (4E, 9 mm; Millar Instruments Inc., USA) was inserted into the left ventricle via the right common carotid artery. After the acclimatization period, saline or 3HPPA was injected in increasing doses ranging from 0.2 to 25 mg/kg via vena saphena sinistra. Specific contractility and relaxation parameters were calculated using PVAN software version 3.6 (Millar Instruments).

2.4.3 Pharmacokinetics

In six Wistar rats (average weight 410 g) the plasma levels of 3HPPA were measured. The procedure was analogous. The animals received 10 or 25 mg/kg of 3HPPA under urethane anesthesia via vena saphena sinistra and blood samples were taken from arteria carotis communis sinistra in approximate volumes of 350 μL at the following time intervals 0; 5; 10; 15; 30; 45; 60; 90; 120 min. The blood samples were immediately centrifuged (2500 g, 10 min, MPW-52, MPW Med. Instruments, Poland) and the plasma samples were frozen at –80 °C for subsequent analysis.

2.4.4 Analytical procedure

The determination of 3HPPA in rat plasma was performed using UHPLC–MS/MS. Separation of 3HPPA from other plasma components was achieved with UHPLC system Acquity UPLC (Waters, Prague, Czech Republic) and MS/MS detection with Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters). Analytical column BEH Shield RP C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) was used as a stationary phase. 3HPPA was eluted using gradient elution with methanol and 0.1% formic acid at 40 °C. Five microliters of the extract were injected into the UHPLC–MS/MS system using the partial loop with needle overflow mode. All injected solutions were stored in the autosampler at 4 °C.

The mass spectrometer was operated in negative ESI polarity mode as follows: capillary voltage: -2000 V, ion source temperature: 130 °C, extractor: 3.0 V, RF lens: 0.5 V. The desolvation gas was nitrogen at a flow rate 800 L/h and temperature 450 °C. Nitrogen was used also as a cone gas (100 L/h). Argon was used as a collision gas. Highly selective SRM mode (selected reaction monitoring) was used for quantification using the precursor ion [M-H]⁻ and the corresponding product ion in SRM transition 164.9 → 120.8 (cone voltage 30 V and collision energy 10 eV). MassLynx 4.1 software was used for MS control and data acquisition. QuanLynx software was used for data processing and peak integration.

The sample pretreatment of plasma samples consisted in fast and simple protein precipitation. Fifty microliters of rat plasma was precipitated with 100 μL of acetonitrile. After 10 min, the sample was centrifuged for 10 min. The supernatant was then filtrated through a PTFE membrane with 0.22 μm pores and injected into the UHPLC system.

The obtained pharmacokinetic data were analyzed by PKSolvet, an add-in program for Microsoft Excel.

2.4.5 Statistical analysis

The *in vitro* vasodilatory effect was compared using the 95% confidence intervals of relaxation curves and EC₅₀. The dose-dependent relationship was assessed by Person correlation followed by linear regression. Differences between saline and 3HPPA were compared using a one- or two-way ANOVA followed by Sidac post hoc test (GraphPad Prism version 6.0, GraphPad Software, USA).

3 Results

3.1 Comparison of *in vitro* vasodilatory potencies of quercetin and its metabolites

Norepinephrine induced a sustained vasoconstriction in the isolated endothelium-intact aortic rings from healthy rats. Cumulative concentrations (ranging from 10 nM to 100 μM) of quercetin or its metabolites provoked dose-dependent

vasodilatation of contracted aortas to a varying extent. Quercetin, its methylated metabolites tamarixetin and isorhamnetin, 4-methylcatechol, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid /3HPPA/, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 3-coumaric acid, and 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid in the final tested concentration range (up to 100 μM) achieved 100% relaxation of aorta rings (Supporting Information Fig. 2). However, their effects were very diverse. The most active structure was 3HPPA (Supporting Information Fig. 3) that resulted in vasodilation in a concentration of 100 nM while quercetin required a dose of 500 nM. Methyl derivatives of quercetin, isorhamnetin, and tamarixetin, as well as 4-methylcatechol behaved almost identically to quercetin. On the other hand, 3-coumaric acid and 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid caused vasodilation at higher concentrations (more than 10 μM). 3-hydroxyphenylacetic acid, 3-hydroxybenzoic acid, and phloroglucinol were able to cause relaxation in a lesser extent and in higher concentrations. Other tested compounds (homovanillic acid, quercetin-3-O-glucuronide, 3-phenylpropionic acid, 2-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid) had the same vasodilatory potential as the solvent, and hence were considered to be ineffective.

The order of vasodilatory activity at the 95% confidence interval of vasodilatory curves was as follows: 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid > tamarixetin = isorhamnetin = quercetin = 3,4-dihydroxyphenylacetic acid = 4-methylcatechol = 3-coumaric acid = 3-hydroxyphenylacetic acid > 3-hydroxybenzoic acid = phloroglucinol > 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid > solvent. When all compounds were analyzed by EC₅₀ (Fig. 2), the concentration at which each reached 50% vasodilatory effect, the order was similar but not identical. 3HPPA was clearly the most efficient compound with about an order better activity than the other metabolites and quercetin.

3HPPA vasodilatory potential was confirmed in experiments on isolated renal artery (Supporting Information Fig. 4).

3.2 *In vivo* effect of the most effective compound, 3HPPA, in rats

The *in vitro* results showed that 3HPPA was the most active compound, and was thus tested on the animals. In normotensive rats, the compound decreased both systolic and diastolic blood pressure dose-dependently from the dose of 2.5 mg/kg (Fig. 3). There was no significant difference between the magnitude of decrease in systolic and diastolic blood pressures. In both, the recovery of blood pressure to basal values was rapid. The heart rate was not significantly influenced at any of the tested doses (Supporting Information Fig. 5). Analysis of heart hemodynamics suggested that the drop in arterial blood pressure was caused by peripheral action. This

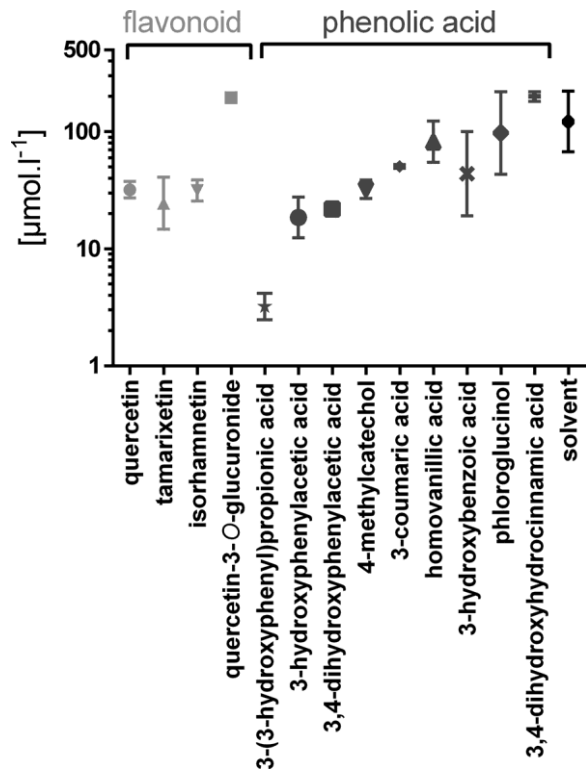


Figure 2. EC₅₀ vasodilatory activity of tested compounds on isolated aortic rings. Graphs show EC₅₀ with 95% confidence intervals for easier comparison. The other tested metabolites (3-phenylpropionic acid, 2-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid) are not shown as they were inactive.

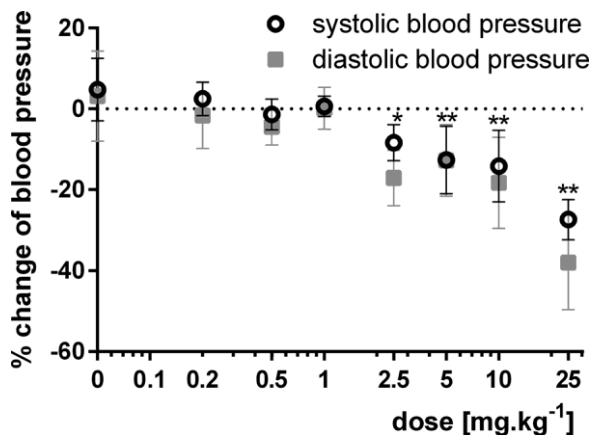


Figure 3. Change of systolic and diastolic blood pressure after bolus i.v. administration of 3HPPA in normotensive rats ($n = 5$). Data are shown as means \pm SD.

conclusion was suggested firstly by the fact that the stroke volume was not significantly changed (Supporting Information Fig. 6A). Further analysis confirmed this to be true. Although on first sight, the contractility parameter dp/dt_{max} dropped significantly from a concentration of 2.5 mg/kg (Supporting

Information Fig. 7A), it is well known that this parameter can be influenced by the volume/pressure changes in the left ventricle [22]. This was indeed found in our experiments, where a decrease in arterial blood pressure was reflected as a significant drop from 2.5 mg/kg in maximal systolic pressure in left ventricle (Supporting Information Fig. 6B). Firstly, we divided dp/dt_{max} by end-diastolic volume in order to eliminate the influence of volume. Contractility expressed using this parameter was unchanged (Supporting Information Fig. 7B), but because an insignificant tendency to decrease in contractility was seen at highest concentration, we used as well, another modification that is known to decrease the volume/pressure interference— dp/dt_{max} divided by left ventricular pressure at this maximum [22]. Again no significant changes in any tested concentration (Supporting Information Fig. 7C) suggested no effect on cardiac contractility. Similarly, negative peak of dp/dt initially dropped (Supporting Information Fig. 7D), but when relaxation was expressed by the more specific parameter tau (the time constant of left ventricular isovolumic pressure decay, Supporting Information Fig. 7E) [23], no significant changes were found. In agreement with this, minimal pressure in the left ventricles increased slightly (about 1 mmHg) at the highest dose, 25 mg/kg (Supporting Information Fig. 6C).

To confirm the results in hypertensive rats, infusions at three different rates were given as well to SHR to mimic the slow absorption of the compound from the colon. At the highest rate (5 mg/kg/50 L/min) the arterial blood pressure significantly decreased after 1 min, reached a maximum after 90 s, then started to normalize slowly and reached basal levels within 5 min (Fig. 4A, B). Smaller rates followed the same course but with lower effects (Supporting Information Fig. 8). When we summarized the data, both systolic and diastolic blood pressure decreased in a dose-dependent linear manner (Fig. 4C), however only the infusion at the highest rate (5 mg/kg/50 L/min) significantly decreased arterial blood pressure compared to saline.

3.3 Assessment of 3HPPA mechanism of action

Firstly, we tested if the effect of 3HPPA was based on the endothelium (Fig. 5A, Supporting Information Fig. 9). In contrast to quercetin (Fig. 5B), which retained its effect in endothelium-denuded rings, in the case of 3HPPA, a very marked drop in effect was observed. We therefore tested if NO might be responsible for this. In the presence of the NO-synthase blocker, L-NAME, the vasodilatory effect of 3HPPA was absolutely abolished. In contrast, NO release did not play a role in quercetin vasoactive properties as preincubation with L-NAME did not shift the quercetin relaxation curve. Finally, we tested if NO release might be based on stimulation of muscarinic receptors, but this was not very likely, since the M-blocker atropine only slightly shifted the vasodilatory curve of 3HPPA to the right. Similar results were found for quercetin.

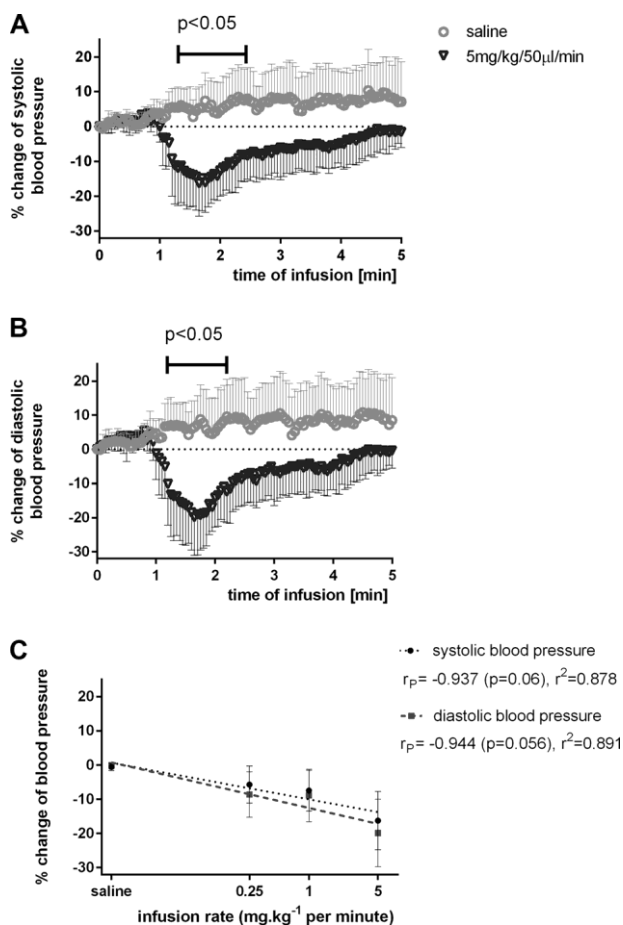


Figure 4. Effect of 3HPPA in infusion on arterial blood pressure in SHR rats ($n = 6$). (A, B) Effect of the highest rate infusion of 3HPPA on systolic and diastolic pressure, respectively. (C) The linear dose-dependent relationship between the rate of infusion per minute and maximal per cent change in arterial blood pressure. Data are shown as means \pm SD.

In order to test if 3HPPA would modify the vasoconstrictor response of NE, we tested the effect on animals repeatedly challenged with the same doses of NE after administration of 3HPPA. However, this compound did not affect the rise in blood pressure after NE administration in any of the tested doses (Supporting Information Fig. 10AB). The heart rate too was not affected either with the exception of the dose of 0.2 mg/kg, when the compound caused a slight decrease in the NE augmented heart rate (Supporting Information Fig. 10C).

3.4 Pharmacokinetics of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid

Finally, we analyzed the basic pharmacokinetics parameters of 3HPPA in the two highest doses (Table 1). As expected, the higher dose resulted in a proportional increase in the maximal plasma concentration achieved, but interestingly, the

highest dose had longer elimination half-life (41 ± 8 versus 20 ± 3 min) and correspondingly lower total clearance. The volume of distribution was comparable for both doses.

4 Discussion

Flavonoids are known to be health-beneficial components of human diets due to their various presumed protective effects including those on the cardiovascular system. However, the purported cardiovascular effects are based mainly on *in vitro* and epidemiological studies and hence not confirmed in humans with few exceptions [2, 6, 7, 24]. Further, little is known about the underlying mechanism(s) of flavonoid action. Erstwhile theories that explained flavonoid effects as solely due to direct antioxidant activity are being slowly replaced by more complex understanding of the direct effects of flavonoids on enzymes, aggregation cascade, and vascular smooth muscles [1, 2, 6, 7, 25]. The latter is relevant to this study.

The activity of flavonoids on vascular smooth muscles has been studied largely only with aglycones (even though they are generally not found in plasma or in very low concentrations) [9, 10], and unfortunately, studies that analyzed the effect of in-plasma-present flavonoid metabolites are rare. The same is true for quercetin and its metabolites. Quercetin given orally as the parent compound or in the form of naturally occurring glycosides (rutin, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-4'-O-glucoside) is likely partly absorbed as the aglycone but immediately metabolized especially by conjugation or methylation even in gastrointestinal mucosa and later in the liver. Hence no parent quercetin-glycosides and very low levels of pure quercetin are detected in plasma [12–15]. Some glycosides may have better absorption than the pure quercetin. Nevertheless, they are also rapidly metabolized and no parent glycosides have been detected in plasma [16]. Quercetin yields various metabolites with retained flavonoid structure, among others, glucuronides, sulphates, diglucuronide, glucuronide-sulphate of quercetin or its methylated metabolites isorhamnetin and tamarixetin [17, 18]. In the latter two cases, only low concentrations of nonconjugated isorhamnetin and tamarixetin are found in plasma [14, 15].

Pure quercetin has *in vitro* vasodilatory effects on vascular smooth muscle cells [26]. This was seen as well in this study (Supporting Information Fig. 2). Apparently, the ring B substitution by a small substituent is not the most important factor for the vasodilatory potential since kaempferol and quercetin were similarly efficient in another study [29] and quercetin, isorhamnetin, and tamarixetin in the current one (Supporting Information Fig. 2A and Fig. 2). However, in contrast to pure quercetin or its methylated metabolites, quercetin-3-O-glucuronide, and quercetin-3'-sulphate had no direct vasodilatory effects *in vitro* [27], and similarly quercetin-3'-sulphate did not affect arterial blood pressure *in vivo* [28]. Interestingly, the blood pressure significantly decreased one hour after the i.v. administration of quercetin-3-O-glucuronide in SHR [28]. The authors

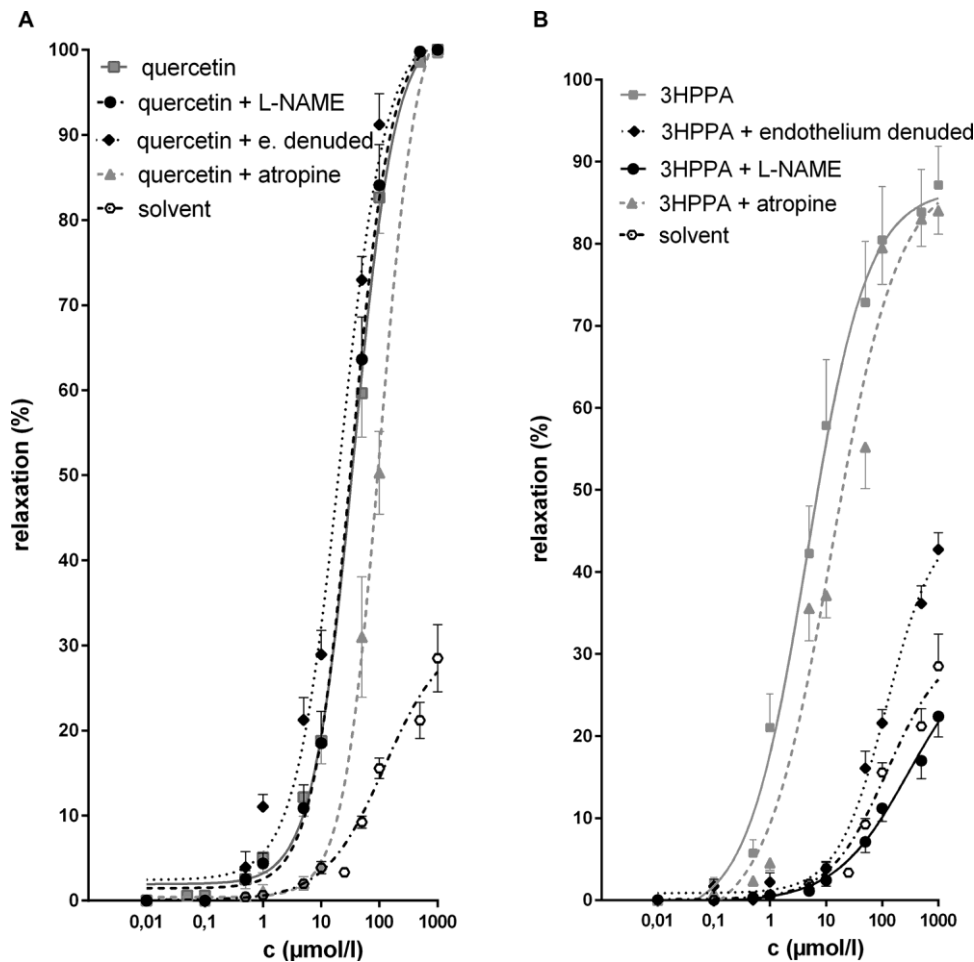


Figure 5. Effect of quercetin (A) and 3HPPA (B) on aortic rings precontracted with NE. All experiments are means from experiments with at least six aortic rings.

Table 1. Basic pharmacokinetic parameters after a single bolus dose of 3HPPA

	10 mg/kg		25 mg/kg	
	Mean	± SD	Mean	± SD
C_{max} (g/mL)	19	± 7	80	± 2
$t_{1/2}$ (min)	20	± 3	41	± 8
Cl (g/kg)/(g/mL)/min	23.8	± 1.4	6.1	± 0.5
Vd (g/kg)/(g/mL)	490	± 188	349	± 14

suggested that this was based on deconjugation of quercetin-3-O-glucuronide into quercetin [29]. A study on human volunteers provided similar conclusions [30].

However, the hypothesis of quercetin-3-O-glucuronide as a quercetin carrier cannot explain why the i.p. administration of quercetin was less efficient than the oral, in particular, if the i.p. route resulted in higher plasma levels of metabolites with retained flavonoid core [1]. After i.p. administration, the substances pass directly via the portal circulation to the liver where they can be metabolized before reaching the systemic circulation. In the case of oral intake of quercetin or its glycosides, only a small part is absorbed in the upper gastroin-

testinal tract and a large portion reaches the colon. The small phenolic acids are important flavonoid metabolites formed by intestinal microflora. Being quite small molecules, they are absorbed and can have pharmacological effects that are largely unknown. Their anti-platelet and anti-inflammatory effects [31–33] have been reported, but as far as we know, no published study has addressed their effects on vascular smooth muscles and hemodynamics. For these reasons, we suggest that the smaller activity of i.p. given quercetin could then be related to the lack of specific metabolite(s) formed by colonic metabolism. Small phenolic acids formed from quercetin in the colon by human microflora relaxed vascular smooth muscles *in vitro* with 3HPPA being the most potent. Our subsequent experiments therefore focused on this compound. Complementary analysis *in vivo* has shown that the 3HPPA effect is based on its peripheral activity in vascular beds and is NO dependent. The minimal dose required for a significant effect was 2.5 mg/kg. This represents an approximate dose of 1 mg in a rat. It is not easy to transform these data to a dose effective in humans but the dose appears to be quite low. Unfortunately, there are almost no data on 3HPPA-plasma/urine concentrations in humans. Only one study measured concentration of this metabolite in

plasma, but this was done only after eating a meal containing flavonoids once daily for 5 days [34]. This is very different to pharmacological administration of quercetin. Nevertheless, that study reveals two interesting facts: (1) 3HPPA was not conjugated in plasma and (2) its basal plasma level was about 30 nM. The latter is quite important given that the volunteers consumed a diet low in flavonoids for the rest of the day and the half-life of 3HPPA is short (Table 1). The long-term presence of 3HPPA in plasma despite its short half-life can be explained by available studies which document that 3HPPA is a metabolite not only of quercetin but also of some other phenolic compounds in human diets (e.g. flavanols including oligomeric proanthocyanidins, diosmin, caffeic acid, chlorogenic acid) [14, 35–38] and these may ensure a continuous supply from colon metabolism through a normal human diet. This fact supports its possible pharmacological importance.

Our *in vivo* results indicate that the immediate drop in blood pressure after 3HPPA administration was caused by its direct vasorelaxant properties. The substance did not affect either the contractility or heart rate (changes in both can participate in blood pressure regulation). This study cannot fully answer the question whether 3HPPA is the metabolite mainly responsible for the blood pressure-decreasing effect of quercetin after oral consumption or if it participates in the greater response found after oral intake of quercetin compared to the *i.p.* route. However, it is the first study showing that a phenolic acid formed by human microflora is able to reduce arterial blood pressure. We reiterate, this compound can be formed from a number of phenolic compounds present in common diets. For example, it has been detected in urine after intake of chocolate [39]. Indeed, the strongest evidence of the blood pressure lowering effect of flavonoids came from cocoa intake, where epicatechin is the major bioactive component. However, studies with epicatechin have demonstrated only a modest blood pressure decrease [5]. Taking into account that the effect of 3HPPA was significant only in higher infusion rates though a clear dose-effect relationship existed, one might expect a small but a significant blood pressure lowering at smaller doses as well, with larger animal samples.

Another new fact from the present study is that the 3HPPA-effect was of short duration. A similar finding was reported in a recent study with a plant extract that rapidly reduced arterial blood pressure by 15–60% in healthy rats after *i.v.* administration but normalization followed within 10–30 min. When the same extract was given as gastric gavage to SHR rats, the effect was much smaller and persistent [40]. In the present study, we used a slow infusion to mimic the continuous 3HPPA absorption from the colon and the antihypertensive effect was again normalized quite rapidly. It is possible that (1) 3HPPA has a short-term effect and other metabolite(s) could be responsible for the persisting fall in blood pressure or (2) when administered separately, 3HPPA is unable to cause a long-lasting decrease in blood pressure because some other flavonoid metabolite(s) are needed to first

potentiate its effect. For example, oral quercetin decreased not only the systolic blood pressure but the heart rate in SHR as well [1, 28]. In the present study, no direct effect on heart rate was observed after 3HPPA (Supporting Information Fig. 5). This discrepancy may be likely explained by the presence and effects of other metabolite(s) formed after quercetin administration. Additionally, despite the short duration of the effect, 3HPPA may potentiate the effects of known antihypertensive drugs. For example in a recent study, oral quercetin potentiated the positive effect of losartan on anthracycline cardiotoxicity [41]. This might be true as well for high blood pressure. Quercetin and similar compounds could be useful adjuvant therapeutic means for hypertension treatment in humans. Further studies are necessary to confirm this hypothesis and some are currently ongoing in our laboratory.

In conclusion, we found that some quercetin metabolites formed by human microflora have vasodilatory effects *in vitro* on the aortic vascular smooth muscle. The most effective compound, 3HPPA, was about one order more potent than quercetin. Its direct arterial blood pressure lowering effects were confirmed *in vivo* in both healthy and spontaneously hypertensive rats. Regarding the mechanism of action, the endothelium and NO were found to play a role in 3HPPA-induced vascular relaxation.

This study was supported by the grant of The Czech Science Foundation (project No. P303/12/G163) and Charles University in Prague (No. 253115 C and SVV 260 064). We would like to thank Dr. Alexander Oulton for critical reading of the manuscript.

I.N., J.P., M.V., and V.S. participated in vitro experiments, I.N., J.P., and P.M. performed in vivo experiments, V.P. and L.N. were responsible for the analytical part. I.N. analyzed the data and P.M. wrote the article. All authors participated in the revision.

The authors declare no conflict of interest.

5 References

- [1] Galindo, P., Gonzalez-Manzano, S., Zarzuelo, M. J., Gomez-Guzman, M. et al., Different cardiovascular protective effects of quercetin administered orally or intraperitoneally in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* 2012, 3, 643–650.
- [2] Mladenka, P., Zatloukalova, L., Filipovsky, T., Hrdina, R., Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, 49, 963–975.
- [3] Johnson, S. A., Figueroa, A., Navaei, N., Wong, A. et al., Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Acad. Nutr. Diet.* 2015, 115, 369–377.
- [4] Novotny, J. A., Baer, D. J., Khoo, C., Gebauer, S. K., Charon, C. S., Cranberry juice consumption lowers markers of

- cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. *J. Nutr.* 2015, *145*, 1185–1193.
- [5] Ellinger, S., Reusch, A., Stehle, P., Helfrich, H. P., Epicatechin ingested via cocoa products reduces blood pressure in humans: a nonlinear regression model with a Bayesian approach. *Am. J. Clin. Nutr.* 2012, *95*, 1365–1377.
- [6] Edwards, R. L., Lyon, T., Litwin, S. E., Rabovsky, A. et al., Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J. Nutr.* 2007, *137*, 2405–2411.
- [7] Egert, S., Bosy-Westphal, A., Seiberl, J., Kurbitz, C. et al., Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br. J. Nutr.* 2009, *102*, 1065–1074.
- [8] Dower, J. I., Geleijnse, J. M., Gijbbers, L., Zock, P. L. et al., Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015, *101*, 914–921.
- [9] Williamson, G., The use of flavonoid aglycones in vitro systems to test biological activities: based on bioavailability data, is this a valid approach? *Phytochem. Rev.* 2002, *1*, 215–222.
- [10] Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M. et al., Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox. Signal.* 2013, *18*, 1818–1892.
- [11] Chirumbolo, S., Role of quercetin in vascular physiology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2012, *90*, 1652–1657.
- [12] Gormaz, J. G., Quintremil, S., Rodrigo, R., Cardiovascular disease: a target for the pharmacological effects of quercetin. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015, *15*, 1735–1742.
- [13] Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M. D., Blaut, M., Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.* 1999, *171*, 81–91.
- [14] Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R. et al., Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, *36*, 212–225.
- [15] Braune, A., Gutschow, M., Engst, W., Blaut, M., Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, *67*, 5558–5567.
- [16] Serra, A., Macià, A., Romero, M.-P., Reguant, J. et al., Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chem.* 2012, *130*, 383–393.
- [17] Graefe, E. U., Derendorf, H., Veit, M., Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 1999, *37*, 219–233.
- [18] Olthof, M. R., Hollman, P. C., Buijsman, M. N., van Amelsvoort, J. M., Katan, M. B., Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* 2003, *133*, 1806–1814.
- [19] Sawai, Y., Kohsaka, K., Nishiyama, Y., Ando, K., Serum concentrations of rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans. *Arzneimittelforschung* 1987, *37*, 729–732.
- [20] Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., McKinley, A. J. et al., Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, *88*, 1018–1025.
- [21] Najmanova, I., Voprsalova, M., Mladenka, P., Vasodilatory activity of human quercetin metabolites. *Free Radic. Biol. Med.* 2014, *75*(Suppl 1), S43 (abstract).
- [22] Kass, D. A., Maughan, W. L., Guo, Z. M., Kono, A. et al., Comparative influence of load versus inotropic states on indexes of ventricular contractility: experimental and theoretical analysis based on pressure-volume relationships. *Circulation* 1987, *76*, 1422–1436.
- [23] Weiss, J. L., Frederiksen, J. W., Weisfeldt, M. L., Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J. Clin. Invest.* 1976, *58*, 751–760.
- [24] Huxley, R. R., Neil, H. A., The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2003, *57*, 904–908.
- [25] Jimenez, R., Lopez-Sepulveda, R., Romero, M., Toral, M. et al., Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food Funct.* 2015, *6*, 409–414.
- [26] Duarte, J., Perez Vizcaino, F., Utrilla, P., Jimenez, J. et al., Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.* 1993, *24*, 857–862.
- [27] Lodi, F., Jimenez, R., Moreno, L., Kroon, P. A. et al., Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* 2009, *204*, 34–39.
- [28] Galindo, P., Rodriguez-Gomez, I., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M. et al., Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS One* 2012, *7*, e32673.
- [29] Terao, J., Murota, K., Kawai, Y., Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone in vivo. *Food Funct.* 2011, *2*, 11–17.
- [30] Perez, A., Gonzalez-Manzano, S., Jimenez, R., Perez-Abud, R. et al., The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacol. Res.* 2014, *89*, 11–18.
- [31] Kim, D. H., Jung, E. A., Sohng, I. S., Han, J. A. et al., Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* 1998, *21*, 17–23.
- [32] Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C. et al., Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009, *53*, 1044–1054.

- [33] Semaming, Y., Pannengetch, P., Chattipakorn, S. C., Chatipakorn, N., Pharmacological properties of protocatechuic acid and its potential roles as complementary medicine. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 2015, 593902.
- [34] Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P. et al., The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 33, 220–235.
- [35] Cova, D., Deangelis, L., Giavarini, F., Palladini, G., Perego, R., Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy-volunteers. *Int. J. Clin. Pharm. Th.* 1992, 30, 29–33.
- [36] Gao, K., Xu, A., Krul, C., Venema, K. et al., Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *J. Nutr.* 2006, 136, 52–57.
- [37] Bazzocco, S., Mattila, I., Guyot, S., Renard, C. M., Aura, A. M., Factors affecting the conversion of apple polyphenols to phenolic acids and fruit matrix to short-chain fatty acids by human faecal microbiota in vitro. *Eur. J. Nutr.* 2008, 47, 442–452.
- [38] Aura, A. M., Mattila, I., Seppanen-Laakso, T., Miettinen, J. et al., Microbial metabolism of catechin stereoisomers by human faecal microbiota: comparison of targeted analysis and a non-targeted metabolomics method. *Phytochem. Lett.* 2008, 1, 18–22.
- [39] Rios, L. Y., Gonthier, M. P., Remesy, C., Mila, I. et al., Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 77, 912–918.
- [40] Luo, L. F., Wu, W. H., Zhou, Y. J., Yan, J. et al., Antihypertensive effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. extracts in spontaneously hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.* 2010, 129, 238–243.
- [41] Matouk, A. I., Taye, A., Heeba, G. H., El-Moselhy, M. A., Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013, 36, 443–450.

SUPPLEMENTARY DATA

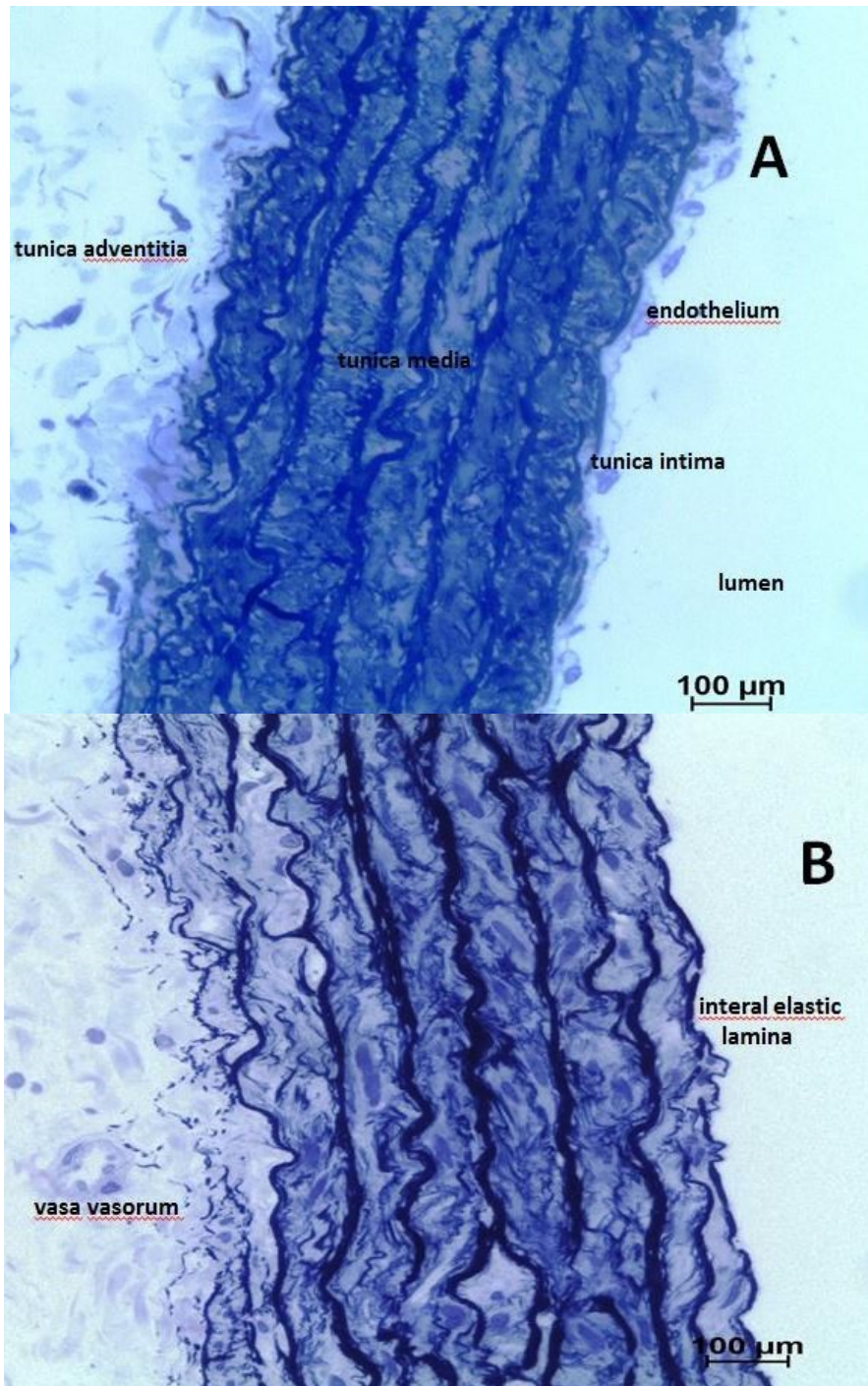
The flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rat.

Iveta Najmanová^a, Jana Pourová^a, Marie Vopršalová^a, Veronika Pilařová^b, Vladimír Semecký^c, Lucie Nováková^b, Přemysl Mladěnka^a

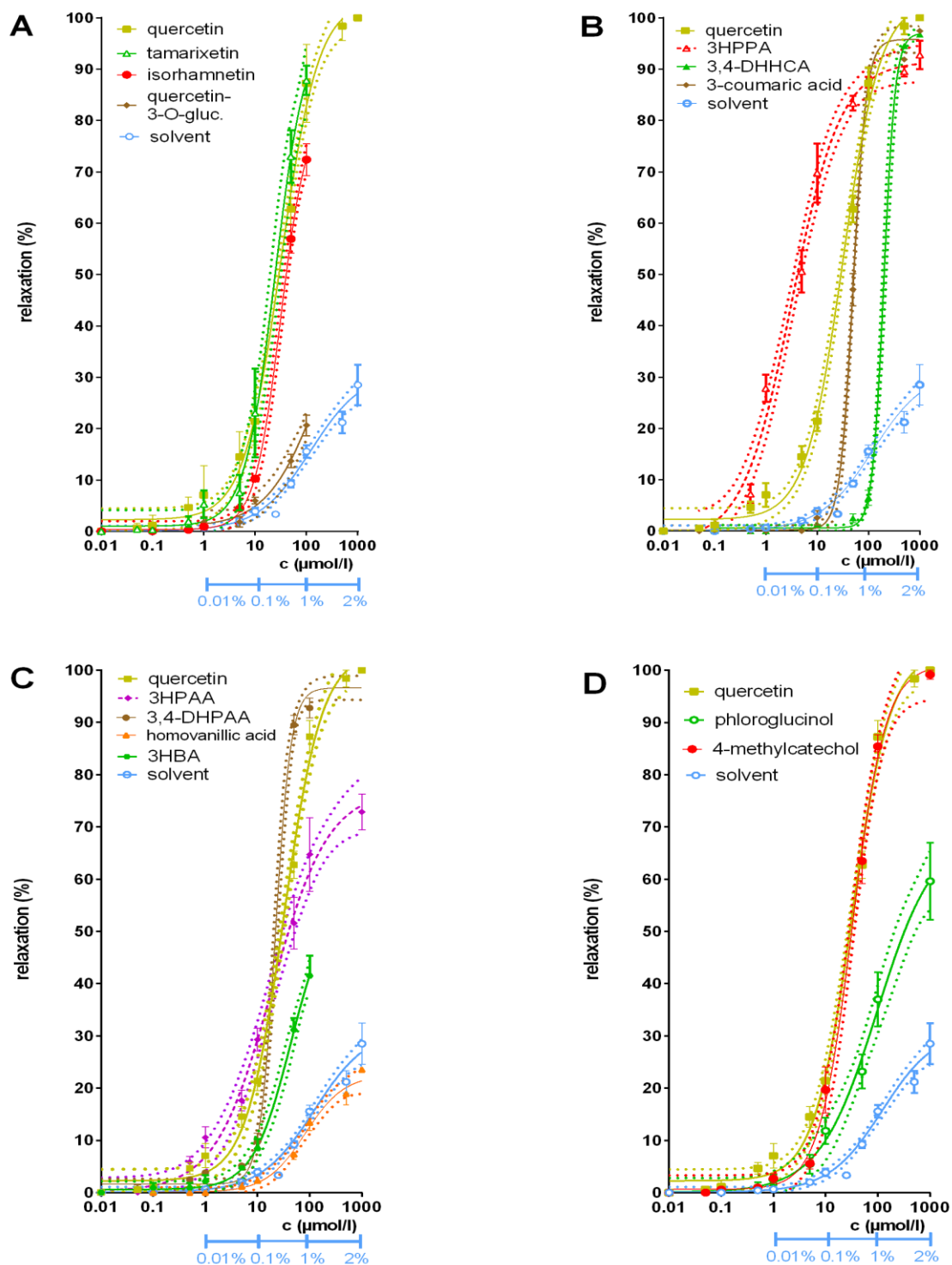
Charles University in Prague; Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 500 05

Hradec Králové, Czech Republic: ^aDepartment of Pharmacology and Farmacology, ^bDepartment of Analytical Chemistry and ^cDepartment of Biological and Medical Science.

11 PAGES

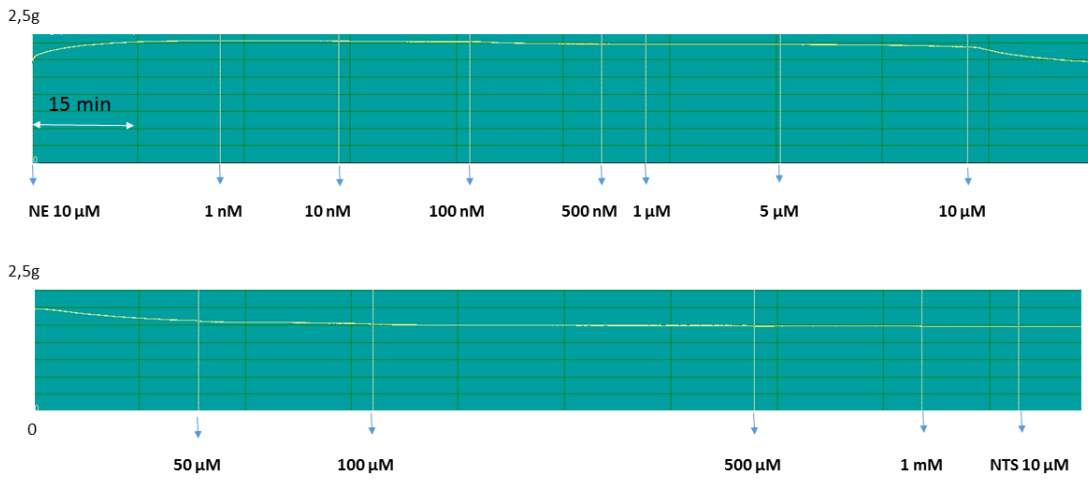


(Fig.S1) Histological confirmation of intact (A) and de-endothelized rat thoracic aorta (B). The parts of selected tissue specimens of aorta were fixed by immersion in cold 3% glutaraldehyde, postfixed in 1% OsO₄ (both in phosphate buffer pH 7.2-7.4), dehydrated in acetone and propylene oxide, and embedded in the resins mixture Durcupan ACM and Epon 812. The semithin sections thickness about 1µm were cut on the ultramicrotome LKB and stained with toluidine blue. The section were examined and documented under light microscope OLYMPUS AX-70 with digital camera Prog Res CT 3 and image analysis processor NIS – ELEMENTS AR 4.00.11

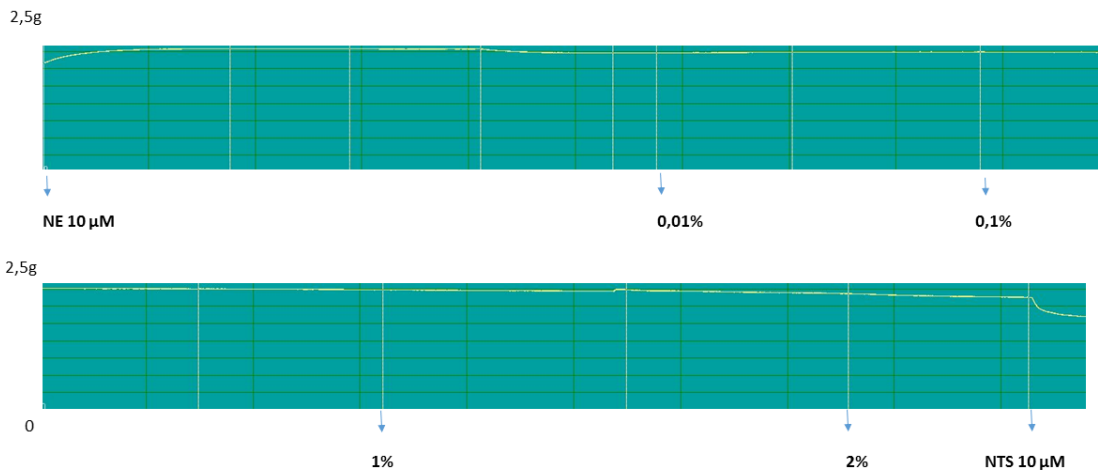


(Fig. S2). Effects of quercetin and its metabolites on endothelium-intact rat aorta rings. A: quercetin and its metabolites with intact flavan-core, B: propionic acid metabolites, C: acetic acid and benzoic acid metabolites and D: other metabolites. Quercetin and solvent are always shown for comparison. quercetin-3-O-glu = quercetin-3-O-glucuronide; 3,4-DHHCA = 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid; 3HPAA = 3-hydroxyphenylacetic acid; 3HPPA = 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid; 3,4-DHPAA = 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; 3HBA = 3-hydroxybenzoic acid. Each curve is an average of at least 3 aortic rings, in very active compounds (with an effect in units of μM) from at least 5 rings. Data are shown as averages \pm SEM. The concentration of DMSO is shown in light blue below the x axis.

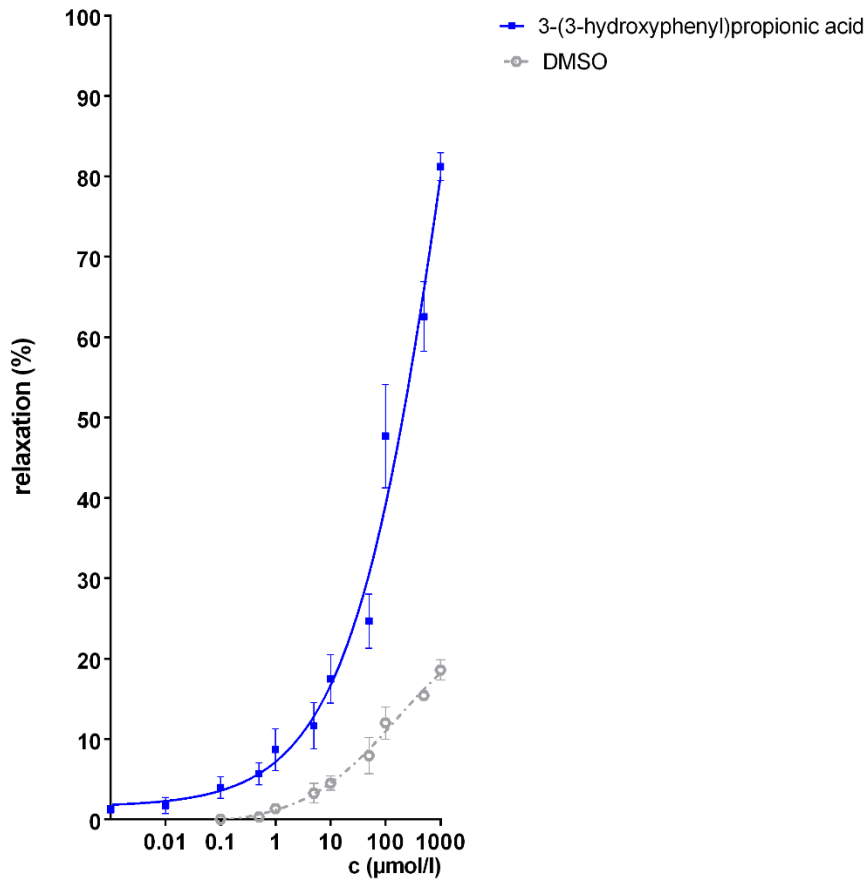
A



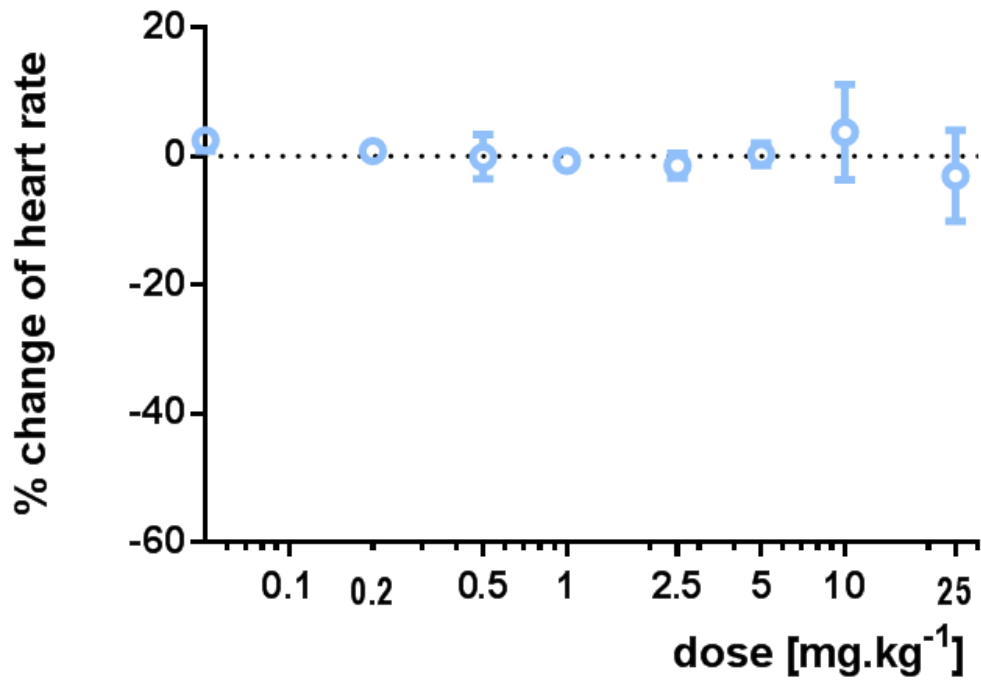
B



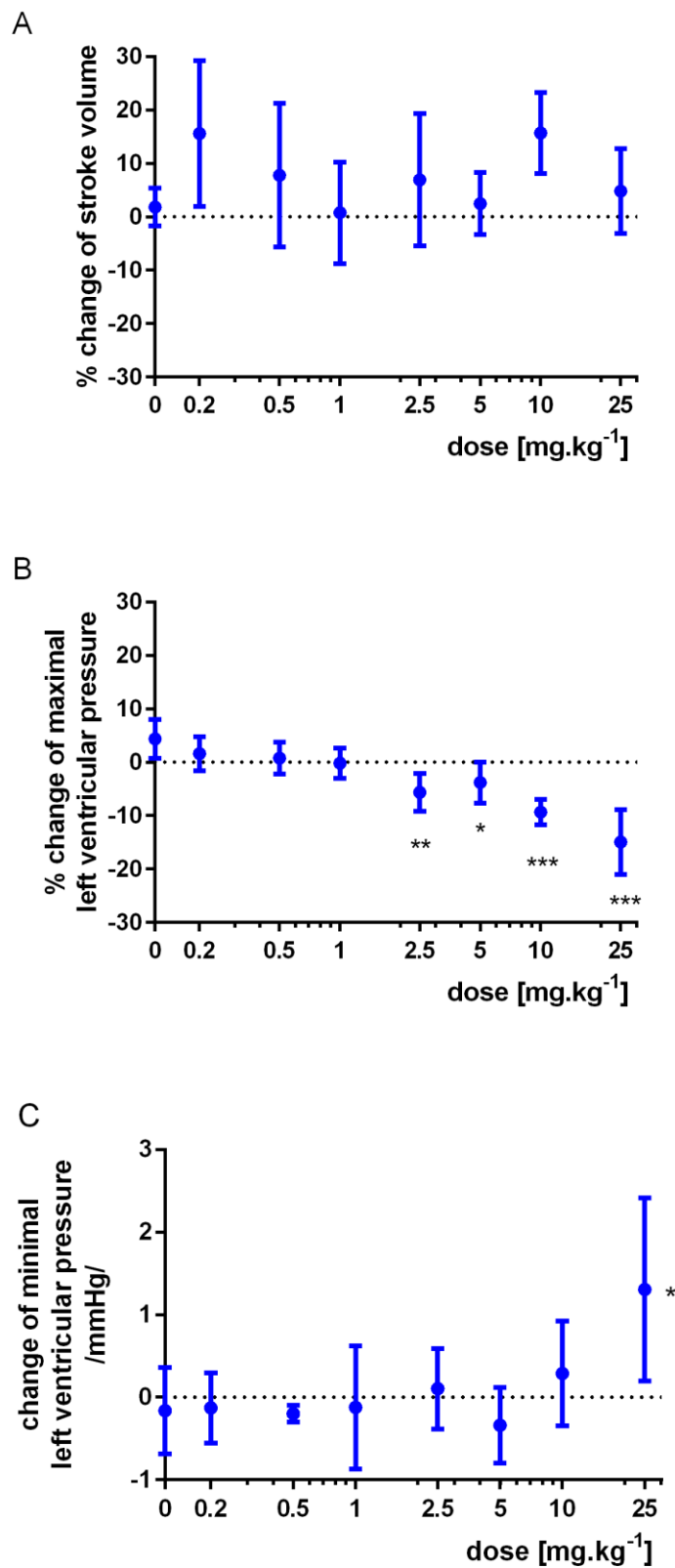
(Fig. S3). Original recording of an experiment showing vasorelaxant activity of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid (A) and solvent (B) in intact isolated aorta (with endothelium). NE: norepinephrine, NTS: sodium nitroprusside



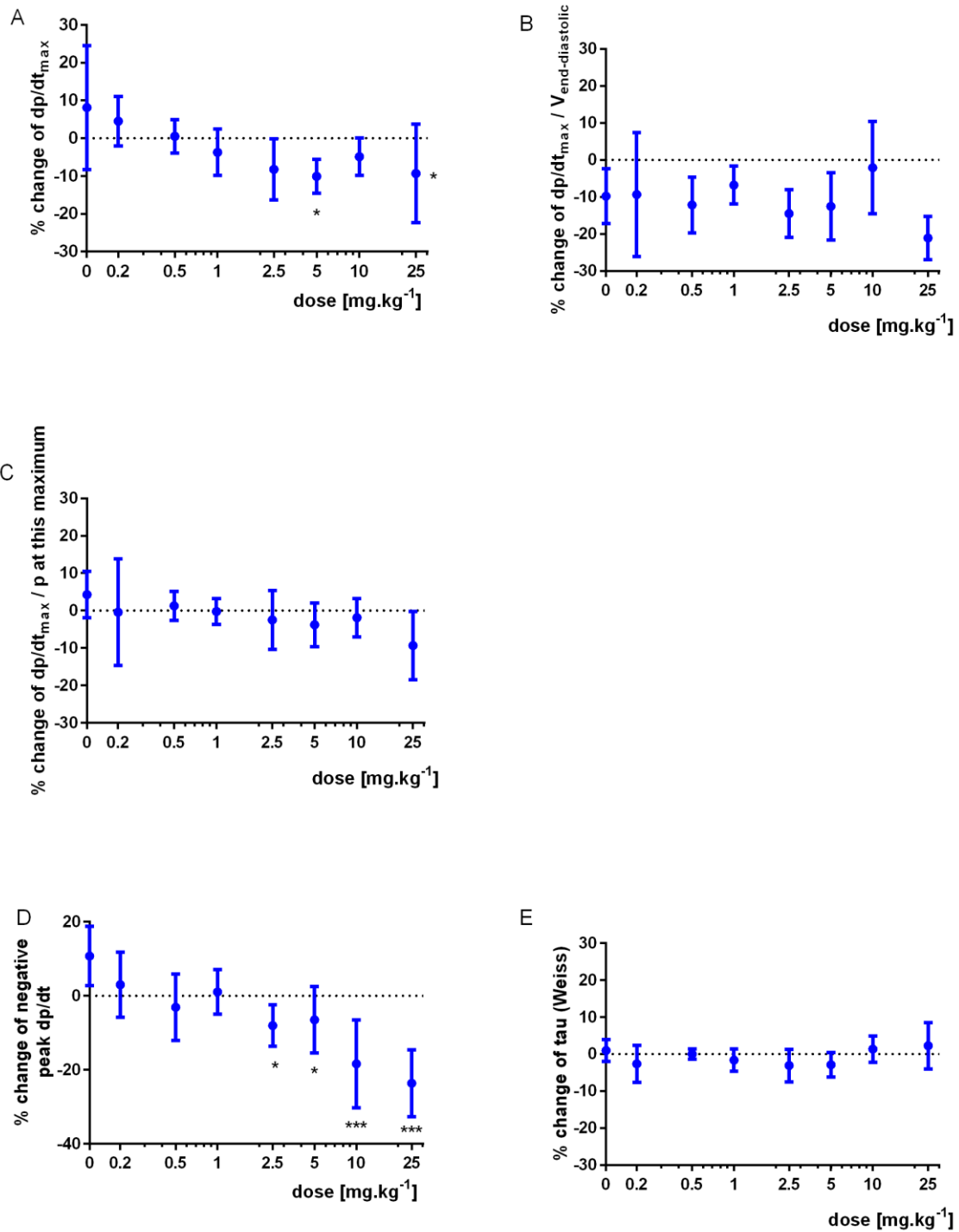
(Fig. S4). Effect of 3-(3hydroxyphenyl)propionic acid on arteria renalis precontracted with noradrenaline (10 µmol/l). The curve of the compound was constructed by use of 8 experiments, that of DMSO from 3 experiments.



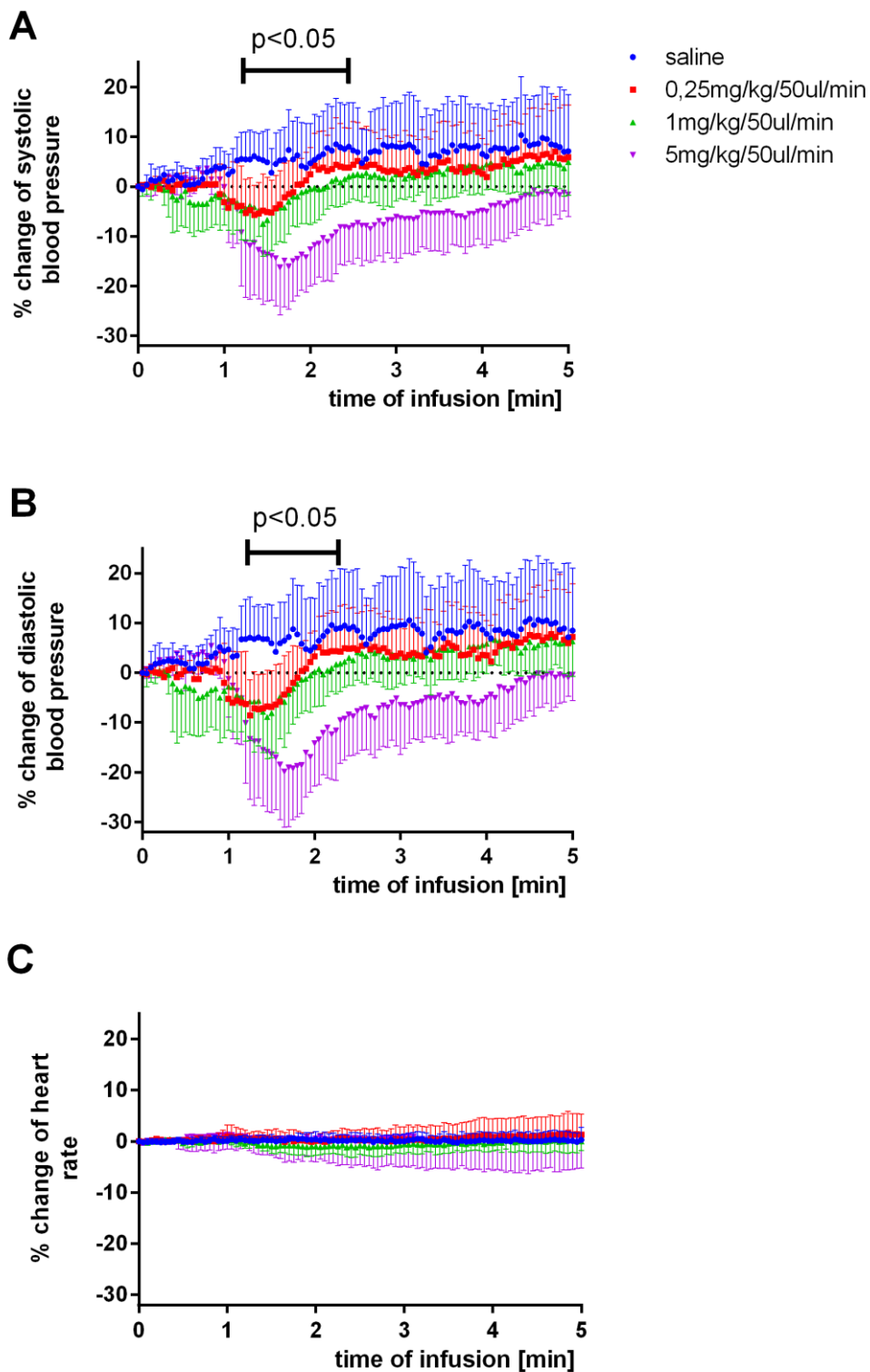
(Fig.S5) The influence of increasing doses of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid on heart rate in normotensive rats (n=5). At any dose, the heart rate was not significantly changed. Data are shown as means \pm SD.



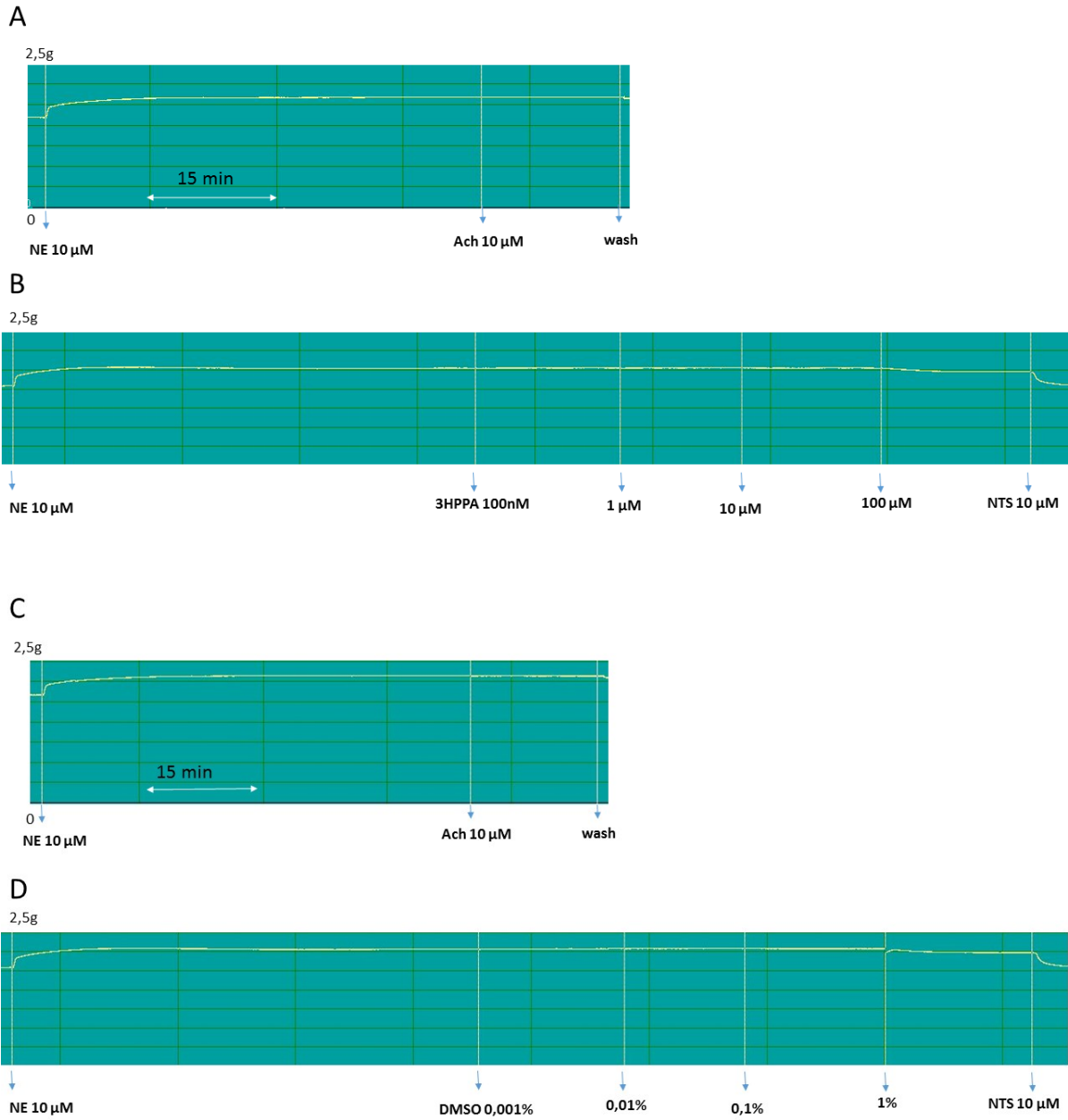
(Fig.S6) The effect of increasing doses of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid on stroke volume (A), maximal (B) and minimal (C) left ventricular pressure in normotensive rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. saline. Data are averages from 5 rats. Data are shown as means \pm SD.



(Fig.S7) The effect of increasing doses of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid on the parameters of contractility and relaxation of the left ventricle. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. saline. Data are averages from 5 rats. Data are shown as means \pm SD.



(Fig.S8) The effect of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid infusion on systolic (A) and diastolic (B) blood pressure and heart rate (C) on SHR rats. The $p < 0.05$ is related to the dose of 5mg/kg/50 μ l/min vs. control. The lower rates of 0.25 and 1 mg/kg/50microl/min did not significantly modify arterial blood pressure when compared to the saline. Data are averages from 6 rats in all groups. Data are shown as means \pm SD.



(Fig. S9). Original recordings of an experiment with denuded aortas treated with 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid and solvent. A: confirmation of de-endothelization of aorta and B: effect of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid, C-D analogous recording with solvent. Ach: acetylcholine, NE: norepinephrine, NTS: sodium nitroprusside.

(Fig.S10) The influence of 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid on noradrenaline effects on systolic (A) and diastolic (B) blood pressure and heart rate (C) in normotensive animals. Data summarizes experiments from 5 rats administered with the metabolite and three control (saline) rats. * $p < 0.05$ vs. saline. Data are shown as means \pm SD.

