

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**ÚČINEK METABOLITU QUERCETINU NA  
ISOLOVANÝCH POTKANÍCH ARTERIÍCH**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

Hradec Králové 2018

Simona Rudišarová

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

V Hradci Králové dne.....

.....

Simona Rudišarová

„Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce a vedoucí diplomové práce PharmDr. Marii Vopršalové, CSc. za její postřehy, připomínky a konzultace, kterými mi pomáhala při sepisování práce. Velmi si vážím její ochoty i cenných rad. Dále děkuji ostatním členům výzkumné skupiny Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie za milý přístup a v neposlední řadě také své rodině za podporu během celého vysokoškolského studia.“

# ABSTRAKT

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra farmakologie a toxikologie**

**Studentka:** Simona Rudišarová  
**Školitelka:** PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.  
**Název diplomové práce:** Účinek metabolitu quercetinu na izolovaných potkaních arteriích

Tato práce je věnována výzkumu působení flavonolu quercetinu a jeho vybraných metabolitů (kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové a kyseliny 3-hydroxybenzoové) na cévy v *in vitro* podmínkách. Použita byla standardizovaná metoda izolované aorty potkana. Cílem bylo zjistit, jak látky na izolovanou aortu působí a zda je účinek účinného metabolitu závislý na přítomnosti endotelu v cévě. Po předchozí prekontrakci noradrenalinem byly do lázně k aortálním kroužkům přidávány jednotlivé koncentrace testovaných látek (konečné koncentrace v lázni byly od  $10^{-7}$  do  $10^{-3}$  M). Z naměřených hodnot byly pomocí softwaru *S.P.E.L. Advanced Kymograph Software* získány hodnoty  $EC_{50}$  (quercetin =  $3,63 \cdot 10^{-5}$  M, kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová =  $3,21 \cdot 10^{-6}$  M, kyselina 3-hydroxybenzoová =  $4,38 \cdot 10^{-5}$  M) a sestaveny odpovídající DRC křivky. S quercetinem a kyselinou 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou byl pokus proveden ještě jednou, tentokrát však na cévě s mechanicky odstraněným endotelem. Z výsledků vyplývá, že nejúčinnější látkou ze tří testovaných je kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová, jejíž účinek je (na rozdíl od účinku quercetinu) závislý na přítomnosti endotelu v cévě. Nejmenší schopnost vasorelaxace pak vykazala kyselina 3-hydroxybenzoová.

## ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Pharmacology & Toxicology**

**Student:** Simona Rudišarová  
**Supervisor:** PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.  
**Title of diploma thesis:** The effect of quercetin metabolite on the rat isolated arteries

This study is focused on the research of the effects of flavonol quercetin and its selected metabolites (3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid and 3-hydroxybenzoic acid) on blood vessels *in vitro*. A standardized method of an isolated rat aorta was used. The aim of this study was to find out how substances act on the isolated aorta and if the effect of the effective metabolite is dependent on the presence of the endothelium in the vessel. After precontracting with noradrenaline, individual concentrations of the test substances were added to the aortic ring bath (final concentrations in the bath ranging from  $10^{-7}$  to  $10^{-3}$  M). From the measured values  $EC_{50}$  values (quercetin =  $3,63 \cdot 10^{-5}$  M, 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid =  $3,21 \cdot 10^{-6}$  M, 3-hydroxybenzoic acid =  $4,38 \cdot 10^{-5}$  M) were obtained and the corresponding DRC curves were constructed using *S.P.E.L. Advanced Kymograph Software*. The experiment was performed once again with quercetin and 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid on the endothelium-denuded vessel. According to the results is 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid the most effective substance of the three tested and its effect is (unlike the effect of quercetin) dependent on the presence of endothelium in the vessel. The lowest ability of vasorelaxation was shown by 3-hydroxybenzoic acid.

# OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK .....	8
2.	ÚVOD .....	9
3.	TEORETICKÁ ČÁST .....	11
3.1	Kardiovaskulární systém .....	11
3.1.1	Obecná struktura stěny cév .....	11
3.1.2	Arterie .....	13
3.1.2.1	Aorta .....	15
3.1.2.2	Arteria mesenterica .....	16
3.1.3	Arterioly .....	16
3.1.3.1	Vasokonstrikce a vasodilatace .....	17
3.1.4	Kapiláry .....	17
3.1.5	Venuly .....	19
3.1.6	Veny .....	19
3.1.7	Hladký sval .....	20
3.1.8	Kontrakce hladkého svalu .....	21
3.1.8.1	Molekulární podstata kontrakce .....	22
3.1.9	Regulace krevního oběhu .....	22
3.1.9.1	Místní regulační mechanismy .....	23
3.1.9.2	Celkové regulační mechanismy .....	24
3.2	Flavonoidy .....	26
3.2.1	Obecná charakteristika .....	26
3.2.2	Biosyntéza flavonoidů .....	29
3.2.3	Významné flavonoidy .....	30
3.2.3.1	Flavanoly .....	30
3.2.3.2	Flavonoly .....	31
3.2.3.3	Flavony .....	31

3.2.3.4	Flavanony .....	31
3.2.3.5	Anthokyanidiny .....	32
3.2.3.6	Isoflavony .....	32
3.2.3.7	Proanthokyanidiny.....	33
3.2.4	Quercetin .....	33
3.2.5	Flavonoidy a lidské zdraví .....	36
4.	CÍL PRÁCE .....	37
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38
5.1	Použitý materiál .....	38
5.1.1	Chemikálie.....	38
5.1.2	Přístroje a pomůcky.....	39
5.1.3	Pokusná zvířata.....	40
5.1.4	Látky testované na izolované aortě .....	40
5.2	Příprava Krebsova živného roztoku .....	41
5.3	Metodika .....	42
5.3.1	Zjišťování vasodilatačního účinku quercetinu a jeho metabolitů ...	42
5.3.2	Zjišťování mechanismu účinku quercetinu a jeho metabolitu kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové.....	43
6.	VÝSLEDKY .....	44
6.1	Účinky quercetinu a jeho vybraných metabolitů na izolované aortě potkana.....	44
6.2	Ověřování mechanismu účinku quercetinu a kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové .....	46
7.	DISKUSE.....	48
8.	ZÁVĚR .....	51
9.	LITERATURA .....	52

## 1. SEZNAM ZKRATEK

ACH	acetylcholin
ATP	adenosintrifosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DRC	křivka závislosti na dávce (dose-response curve)
EC <sub>50</sub>	střední účinná koncentrace (effective concentration)
FaF UK	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy
GIT	gastrointestinální trakt
KV	kardiovaskulární
LCMK	kinasa lehkého řetězce myosinu (light-chain-myosin-kinase)
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou (low density lipoproteins)
MÚ	mechanismus účinku
MW	molekulová hmotnost
NO	oxid dusnatý
NORA	noradrenalin
NTS	nitroprussid sodný
RAAS	renin-angiotensin-aldosteronový systém
TK	tlak krve



## 2. ÚVOD

Hlavní příčinou mortality v průmyslově vyspělých i rozvojových zemích jsou v současné době kardiovaskulární nemoci. Patří mezi ně ateroskleróza, onemocnění koronárních tepen, arteriální hypertenze a srdeční selhání. Všechny tyto zdravotní potíže zřejmě souvisejí s působením oxidačního stresu na živý organismus. (Mladěnka et al. 2010).

Nejrozšířenější kardiovaskulární nemocí je hypertenze. Pokud přetrvává delší dobu, způsobuje poškození srdce a krevních cév v ledvinách nebo mozku. To může vést k renálnímu či srdečnímu selhání, koronárním chorobám, iktu a demenci. (Katzung et al. 2012) Vzhledem k tomu, že se jedná o asymptomatický zdravotní problém, zůstává u velkého množství pacientů, kteří nejsou ochotni akceptovat případné nežádoucí účinky léčiv, nedostatečně kompenzována. Compliance navíc snižuje i skutečnost, že se jedná o dlouhodobou terapii. (Ritter et al. 2008)

Flavonoidy jsou polyfenolické sekundární metabolity vyšších rostlin se silnou biologickou aktivitou, které mohou být účinné v prevenci chronických chorob (zejména nemocí kardiovaskulárního systému). (Day et al. 2001, Gross 2004) Jedná se o pigmenty dávající květům, ovoci a listům mnoho odstínů žluté, oranžové a červené barvy, jež v rostlinách vznikají jako odpověď na mikrobiální infekci. (Patel 2008, Kumar a Pandey 2013)

Zatím bylo objeveno více než 4000 flavonoidních struktur. (Patel 2008) Nejprve však byly považovány za vitaminy (kvůli jejich působení na permeabilitu kapilár byly dokonce nazvány vitaminem P). (Perez-Vizcaino a Duarte 2010) Lidské tělo je přijímá v potravě a některých nápojích. Vysoký obsah flavonoidů nalezneme například v jablkách, cibuli, hroznech, kakau, víně nebo čaji. (Gross 2004, Perez-Vizcaino a Duarte 2010)

Dobře známá je jejich antioxidační aktivita zprostředkovaná hydroxylovými skupinami, které fungují jako zhášecí volných radikálů a rovněž dokáží chelátovat kovové ionty. Chelatace kovů pak může být klíčová v prevenci tvorby radikálů, které ničí cílové biomolekuly. (Kumar a Pandey 2013)

Epidemiologické studie navíc naznačují spojitost mezi příjmem flavonoidů a nižším rizikem kardiovaskulárních nemocí. (Gross 2004) Více zkoumány začaly být po vypořádání tzv. francouzského paradoxu, kdy se i přes vysoký příjem nasycených tuků

v potravě snížila kardiovaskulární úmrtnost středomořské populace ve spojitosti s konzumací červeného vína. Bylo zjištěno, že tento efekt je kromě resveratrolu částečně navozen i dalšími přítomnými flavonoidy. (Patel 2008)

Zároveň působí protizánětlivě, antiagregačně a také snižují vysoký krevní tlak a hladinu cholesterolu. Mohou rovněž inhibovat proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a zlepšovat tak funkci cévy. (Gross 2004)

Cílem předkládané práce bylo kvantifikovat vasorelaxační účinky flavonoidu quercetinu a jeho vybraných metabolitů na izolované aortě potkana a následně ověřit roli endotelu při těchto účincích.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Kardiovaskulární systém

Jedna z nejdůležitějších soustav v lidském těle, soustava kardiovaskulární, je tvořena krevním a lymfatickým vaskulárním systémem. Srdce a krevní cévy jsou společně označovány jako krevní vaskulární systém, lymfatické cévy jako vaskulární systém lymfatický. Krevní cévy se dále dělí dle jejich funkce a histologické stavby na arterie (tepny), kapiláry (vlásečnice) a veny (žilky). Přejod mezi nimi je označován jako arterioly (tepénky) a venuly (žilky). (Konrádová et al. 2000, Čihák 1997)

Rozvětvený arteriální systém tvoří trubice, které vedou krev obsahující kyslík a výživné látky od srdce směrem ke tkáním. Postupně se větví a ztenčují, až přejdou v nejtenčí tepénky čili arterioly. Arterioly dále přecházejí v kapiláry, jež tvoří vzájemně propojenou síť. Pomocí nich dochází k výměně látek mezi krví a tkáněmi. Kapiláry pokračují do venul – nejtenčích žilek – které se dále sbírají v systém trubic, jež vede odkysličenou krev s vysokým obsahem oxidu uhličitého a zplodin metabolismu zpět k srdci. Tyto cévy se nazývají veny. (Čihák 1997, Konrádová et al. 2000) Do velkých ven v blízkosti srdce ústí lymfatické cévy, které začínají slepě v podobě lymfatických kapilár a dále anastomozují. (Konrádová et al. 2000)

Kardiovaskulární systém je v těle potřebný pro distribuci kyslíku a nutričních látek směrem ke tkáním a zároveň k odvodu odpadních zplodin metabolismu k exkrečním orgánům. Jeho další funkcí je zajištění transportu hormonů k cílovým orgánům. Vedle nervového systému tedy přispívá k integraci funkce celého organismu. Lymfatický vaskulární systém vrací do krevního oběhu tekutinu z tkáňových prostor. Součástí lymfy se tak stává i tkáňový mok, který se dostane do lymfatických kapilár. (Konrádová et al. 2000)

#### 3.1.1 Obecná struktura stěny cév

V těle se cévní řečiště dělí do několika úseků – těmito úseky tedy musí odpovídat i struktura cévních stěn, aby byly zajištěny jejich funkční nároky. (Čihák 1997) Stavba všech cév však probíhá podle jednotného základního stavebního plánu. Cévní stěnu tvoří tři jednotlivé vrstvy (viz Obr. 1) známé jako *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia* (či *tunica externa*). (Konrádová et al. 2000)

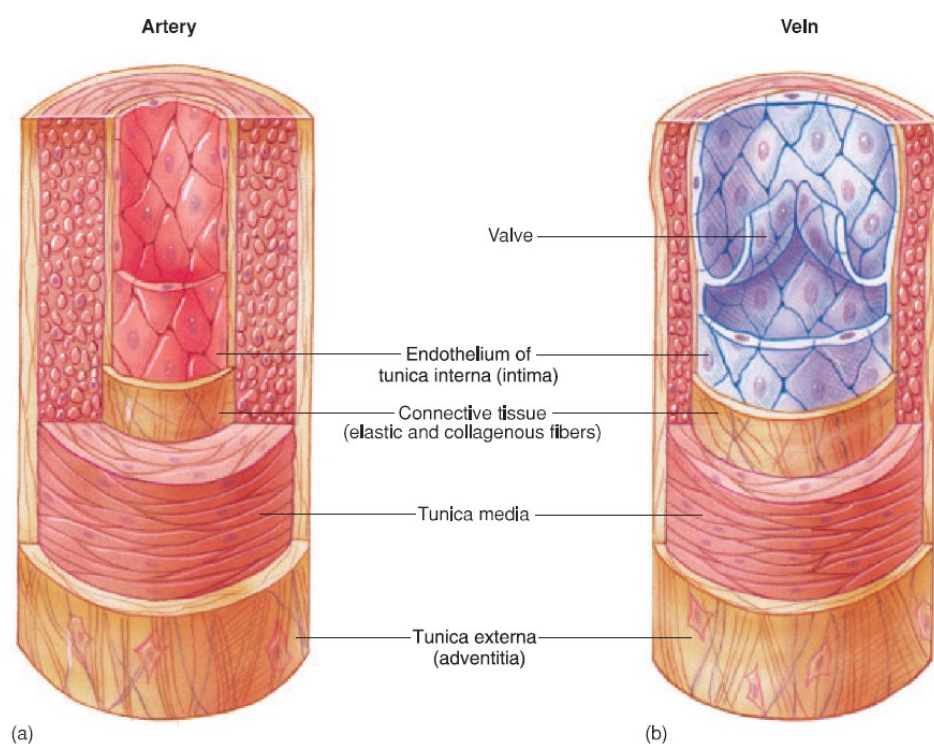
Vnitřní povrch cévy lemují ploché polygonální endotelové buňky, pod nimi se nachází vrstva subendotelová. Tyto dvě komponenty společně vytvářejí vnitřní vrstvu zvanou *tunica intima*. Mezi buňkami endotelu se vyskytují četné těsné spoje (*zonulae occludentes*) i gap junctions. Spočívají na tzv. bazální lamině. Endotel má významný antitrombogenní účinek. Krevní destičky (trombocyty) se přes neporušenou endotelovou vrstvu totiž nedostanou do styku se subendotelovou tkání, na které by docházelo k jejich shlukování a vzniku krevních sraženin – trombů. Kromě toho vykazují endotelové buňky také aktivitu metabolickou. Subendotelovou vrstvu tvoří řídké kolagenní vazivo, které může obsahovat i jednotlivé hladké svalové buňky. (Konrádová et al. 2000) Pokud jsou hladké svalové buňky přítomny, jeví stejně jako vazivová vlákna tendenci k podélnému uspořádání. (Junqueira et al. 1997)

Nejvýraznějšími elementy *tunica media*, které se nacházejí na histologickém řezu cévou, jsou hladké svalové buňky. (Konrádová et al. 2000) Tvoří šroubovitě vinuté koncentrické vrstvy. (Junqueira et al. 1997) Hladké svalové buňky produkují mezibuněčnou hmotu obsahující především glykosaminoglykan chondroitinsulfát a proteoglykany, které ho rovněž obsahují. Dalšími komponentami zde obsaženými jsou elastická a retikulární vlákna. Elastická vlákna jsou spletena do jemných sítí, nebo vytvářejí jemné blanky, v nichž jsou otvory (*fenestrae*) umožňující průnik živin do hlubších partií stěny cév. Tyto blanky se označují jako *membranae fenestratae*. Po obou stranách *tunica media* se někdy tyto elastické útvary koncentrují a vytvářejí *membrana elastica interna*, oddělující *tunica media* od *tunica intima*, a *membrana elastica externa*, oddělující *tunica media* od *tunica adventitia*. (Konrádová et al. 2000) V kapilárách a postkapilárních venulách tvoří vrstvu *tunica media* buňky zvané pericyty. (Junqueira et al. 1997)

Kolagenní vazivo tvoří hlavní část poslední vrstvy zvané *tunica adventitia*. Kromě něj se zde vyskytují i fibroblasty a adipocyty, případně hladké svalové buňky. Uspořádání kolagenních a elastických vláken je převážně longitudinální. Největší zastoupení zde má kolagen typu I a glykosaminoglykany. Z nich převažuje dermatansulfát, v malé míře se vyskytuje i heparansulfát. (Konrádová et al. 2000) *Tunica adventitia* postupně přechází do vaziva orgánu, kterým céva prochází. (Junqueira et al. 1997)

Krevní cévy, které obsahují hladké svalové buňky, bývají inervovány bohatou sítí nemyelinizovaných sympatických vláken. Tyto nervy jsou označovány jako vasomotorické, jejich mediátorem je noradrenalin (NORA). Uvolnění NORA z těchto sympatických vláken vede k vasokonstrikci. Eferentní nervová vlákna však nevstupují až

do *tunica media*, proto je nezbytně nutné, aby byl neurotransmitter schopen několik mikrometrů difundovat. Gap junctions mezi svalovými buňkami potom přenesou podráždění i do vnitřních vrstev cévy. Žíly jsou inervovány méně, avšak nervová zakončení jsou zde nejenom v *tunica adventitia*, nýbrž i v *tunica media*. Senzorická nervová zakončení v tepnách obsahují také baroreceptory a chemoreceptory. Baroreceptory se vyskytují v oblouku aorty a v karotickém sinu, chemoreceptory pak v karotických a aortálních těliscích. (Junqueira et al. 1997)



**Obr. 1** Rozdíly mezi stavbou stěny arterie a veny

Převzato z: Shier et al. (2007)

### 3.1.2 Arterie

Tepny čili arterie mají pevné a pružné stěny. Jsou tak adaptovány na nárazy krve, kterou rytmicky vypuzuje srdce. (Čihák 1997) Rytmickým změnám krevního tlaku (TK) však odolávají především jejich počáteční úseky, koncové spíše regulují průtok krve. (Junqueira et al. 1997) Nejrychleji protéká krev aortou během systoly, během diastoly se rychlost proudění mírně zmenšuje. Ke zpomalování toku krve dochází i při větvení krevního řečiště. (Čihák 1997)

Stěnu každé tepny tvoří tři hlavní vrstvy. Jedná se o vnitřní vrstvu zvanou *tunica intima*, střední vrstvu označovanou jako *tunica media* a vnější vrstvu, která byla pojmenována *tunica adventitia* (či *tunica externa*). (Čihák 1997)

*Tunica intima* je tvořena vrstvou plochých endotelových buněk, pod kterou se vyskytuje útvar zvaný *membrana elastica interna*. Jedná se o elastická a kolagenní vlákna či elastické blanky. Tyto složky se vyskytují ve všech arteriích. Větší tepny se pak od menších odlišují přítomností jemné vrstvy vaziva, která je vložena mezi endotel a elastická vlákna. Ani ta však není ve všech větších tepnách – zcela chybí například v *truncus coeliacus* a v *arteriae mesentericae*. (Čihák 1997)

Endotelová vrstva vytváří hladký povrch, který umožňuje červeným a bílým krvinkám i krevním destičkám protékat cévou, aniž by byly poškozeny. Také předchází krevnímu srážení vylučováním sloučenin, které zpomalují agregaci destiček, a v neposlední řadě pomáhá regulovat lokální tok krve vylučováním látek, které způsobují kontrakci či dilataci krevní cévy. (Shier et al. 2007)

Nejsilnější vrstvou, která se vyskytuje ve stěně tepny, je *tunica media*. Tvoří ji hladké svalové buňky, které mohou probíhat cirkulárně nebo v nízkých spirálovitých závitěch. Mezi nimi a kolem nich jsou potom sítě kolagenních a elastických vláken, případně elastické blanky. (Čihák 1997) Tato pojivová tkáň zajišťuje cévě výraznou elasticitu, která jí umožňuje odolávat silným nárazům krve při srdeční systole a zároveň umožňuje její přizpůsobení se náhlému zvýšení krevního objemu. (Shier et al. 2007)

Podle převažující složky v *tunica media* dělíme tepny na tepny elastického a svalového typu. V prvním případě převažuje elastická složka, v případě druhém složka svalová. Velké tepny, jako například *aorta*, *arteriae iliacae*, *arteriae carotides*, *arteria axillaris* či *arteria subclavia* patří mezi tepny elastické. (Čihák 1997) V *tunica media* obsahují velké množství elastinu. Charakterizuje je silnější *tunica intima* a silně vyvinutá subendotelová vrstva s podélně orientovanými vazivovými vlákny, která hrají důležitou roli při deformaci endotelu během kontrakcí a dilatací tepen. (Junqueira et al. 1997)

Vrstvu *tunica media* tvoří řada perforovaných, koncentricky uspořádaných elastických membrán, které postupně sílí dalším ukládáním elastinu. Mezi nimi jsou hladké svalové buňky, retikulární vlákna a hmota obsahující chondroitin sulfát. *Tunica adventitia*, jež obsahuje elastická a kolagenní vlákna, je poměrně málo vyvinutá. (Junqueira et al. 1997) Elastické tepny se během srdeční systoly rozpínají a během diastoly zase zužují. Dochází tak k pohánění krve a zároveň k záchytu systolického vzestupu krevního tlaku. Díky tomu proudí krev rovnoměrněji. (Čihák 1997)

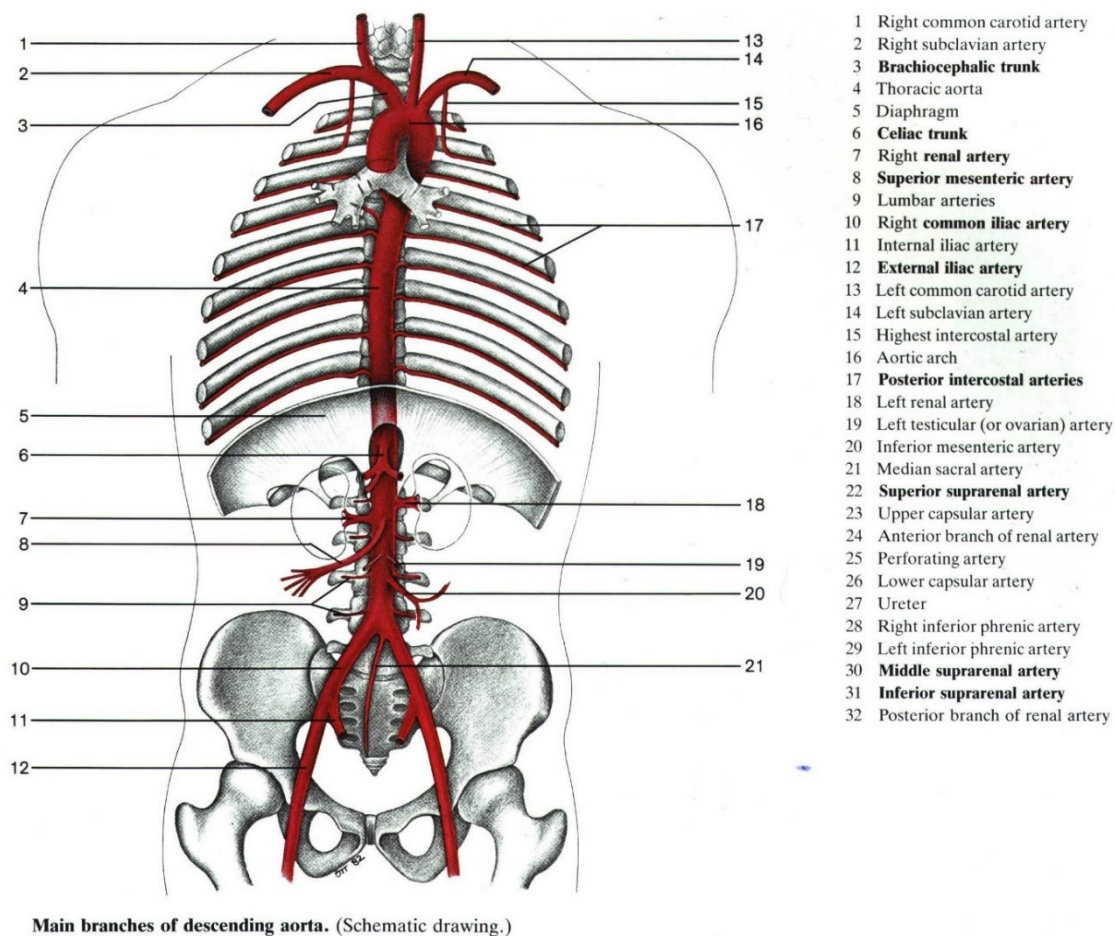
Tepny menšího kalibru bývají čistě svalového typu. (Čihák 1997) Jedná se o většinu arterií v lidském těle. *Tunica media* může obsahovat až 40 vrstev hladkých svalových buněk. Jejich množství se pak snižuje s velikostí průsvitu cévy. Mezi svalovými buňkami se nachází elastické membrány, retikulární vlákna a proteoglykany. *Membrana elastica externa* se vyskytuje jen ve větších svalových arteriích. V *tunica adventitia* jsou zastoupena kolagenní a elastická vlákna, fibroblasty, tukové buňky, lymfatické cévy, *vasa vasorum* a nervy. (Junqueira et al. 1997) Ve své stěně mají regulační aparát měnící průsvit tepny. Tím se reguluje přítok krve do jednotlivých oblastí. Ve středně velkých tepnách se vyskytuje přibližně stejné množství svalové a elastické složky. (Čihák 1997)

Cévní povrch tvořený fibrilárním vazivem s kolagenními i elastickými vlákny se nazývá *tunica adventitia* (či *tunica externa*). Vlákna jsou na povrchu cévy síťovitě překřížena, v nejbližším okolí cévy pak přecházejí do vaziva. Tím dochází k pružné fixaci cévy k okolí. (Čihák 1997) V této vrstvě se vyskytují i nepatrné cévky (tzv. *vasa vasorum*), které dávají vzniknout kapilárám a přivádějí výživu a kyslík pro stěny tepen. (Shier et al. 2007, Čihák 1997) Jedná se o tzv. cévy cév, které se bohatě větví v *tunica adventitia* a rovněž v zevní vrstvě *tunica media*. Tyto vrstvy jsou ve velkých cévách příliš silné a nevyživí je pouze difuze z lumen, proto jim musí být další živiny dodávány přes *vasa vasorum*. Častěji se nacházejí ve venách, což je patrně způsobeno tím, že ve venosní krvi je oproti krvi arteriální menší obsah kyslíku i živin. Odstupují z arterií, které zásobují, nebo z arterií sousedních. Ve vrstvě *tunica adventitia* se v arteriích vyskytují i lymfatické kapiláry. (Junqueira et al. 1997)

Mezi *tunica adventitia* a vrstvou svalových buněk se nachází ještě další elastická vrstvička nazvaná *membrana elastica externa*. Nevyskytuje se však ve všech tepnách, chybí například v tepnách mozku. (Čihák 1997)

### 3.1.2.1 Aorta

Hlavní tepnou lidského těla je srdečnice neboli aorta. (Holibková a Laichman 2004) Jedná se o největší elastickou arterii, která vystupuje z levé srdeční komory a prochází hrudní i břišní dutinou. (Čihák 1997, Naňka a Elišková 2009) Dělí se na tři části: *pars ascendens aortae*, *arcus aortae* a *pars descendens aortae*. (Holibková a Laichman 2004) Na sestupné aortě (viz Obr. 2) dále rozlišujeme část hrudní (*aorta thoracica*) a břišní (*aorta abdominalis*). Ta se v místě tzv. bifurkace rozděluje ve dvě *arteriae iliacae communes*. (Čihák 1997)



**Obr. 2** Hlavní větve descendentní aorty

Převzato z: Rohen et al. (1998)

### 3.1.2.2 *Arteria mesenterica*

Mezi břišní arterie patří také *arteria mesenterica inferior* a *arteria mesenterica superior*. (Naňka a Elišková 2009) Obě odstupují z aorty. *Arteria mesenterica inferior* zásobuje tlusté střevo od *flexura coli sinistra* po horní část rekta, *arteria mesenterica superior* část duodena, pankreatu, celé tenké střevo a část střeva tlustého. (Čihák 1997)

### 3.1.3 Arterioly

Stavba arterioly se do určité míry podobá stavbě arterií, jejich průměr však bývá menší než 0,5 mm. Tvoří je endotel a tenká vrstvička hladkých svalových buněk. Ty v arteriolách probíhají cirkulárně v jedné až pěti vrstvách. (Čihák 1997, Junqueira et al. 1997) Stejně jako v arteriích se zde vyskytuje vrstvička zvaná *membrana elastica interna*. (Čihák 1997) Nachází se však pouze ve větších arteriolách, v menších



může zcela chybět. (Junqueira et al. 1997) Tvoří ji síť vláken, která oddělují endotel od hladkých svalových buněk. Svalové buňky dále pokrývá tenká fibroelastická vrstva. Tepénky jsou poměrně silnostěnné a mají malý průsvit. Ten však pomocí své svaloviny dokáže pohotově měnit, jedná se tedy o hlavní oblast regulace průtoku krve cévním řečištěm. Na svých koncích přecházejí do prekapilár a následně do kapilár. (Čihák 1997)

### 3.1.3.1 *Vasokonstrikce a vasodilatace*

Hladké svalstvo uložené ve stěnách arterií a arteriol je inervováno větvemi sympatiku – jedné ze dvou složek autonomního nervového systému. Jeho vasomotorická vlákna stimulují buňku hladkého cévního svalu ke kontrakci, která se projeví zúžením cévy. Tento proces se nazývá vasokonstrikce. Pokud jsou impulsy potlačeny, svalová vlákna se uvolní a céva opět rozšíří. Zde se jedná o vasodilataci. Vasokonstrikce a vasodilatace jsou tedy procesy, které významně ovlivňují tok krve, a tím i hodnotu krevního tlaku. (Čihák 1997)

### 3.1.4 **Kapiláry**

Cévy s nejmenším průměrem jsou označovány jako kapiláry neboli vlasečnice. (Čihák 1997) Spojují nejmenší arterioly s nejmenšími venulami. Tok krve do kapilár je regulován hladkým svalem, který obklopuje jejich počátek. Jedná se o tzv. prekapilární sfinkter, který může kapiláru kontrakcí uzavřít, nebo naopak relaxací otevřít. Reaguje tak na potřeby buněk – pokud se v buňce nachází nízká koncentrace kyslíku a živin, sfinkter se uvolní, čímž se zvýší přítok krve. Když pak buňka získá dostatek kyslíku a živin, sfinkter opět kontrahuje a přítok krve do kapiláry se sníží, nebo kompletně přeruší. (Shier et al. 2007, Junqueira et al. 1997)

Jejich stěna se skládá z jediné vrstvy endotelových buněk, ke kterým z vnějšího povrchu přiléhají zesíťovaná retikulární vlákna. (Čihák 1997) Produktem endotelu je bazální lamina, která spočívá na povrchu buněk. Endoteliální buňky jsou polygonální, protáhlé ve směru krevního proudu a vyklenují se směrem do lumen v místě, kde mají jádro. V cytoplazmě obsahují velký počet mikrofilament, což zřejmě souvisí s jejich předpokládanou schopností kontrahovat. Mezi buňkami se vyskytují pevné spoje (*zonulae occludentes*) a příležitostně také desmozomy a gap junctions. (Junqueira et al. 1997)

Kapiláru místy pomocí svých tenkých výběžků obemykají pericyty (Rougetovy buňky). (Čihák 1997, Junqueira et al. 1997) Jedná se o mezenchymové buňky, které jsou obklopeny vlastní bazální laminou, jež může splývat s bazální laminou

endotelových buněk. Mají velkou schopnost transformovat se v jiné buňky a také jsou díky obsahu aktinu, myosinu a tropomyosinu schopny kontrakce. V kapilárách nahrazují vrstvu *tunica media*. *Tunica adventitia* je nahrazena přítomností tenké vrstvy kolagenních vláken. (Junqueira et al. 1997)

Průsvit kapiláry obvykle odpovídá rozměru erytrocytů, jejich šířka je však značně proměnlivá. Nejtenčí kapiláry se nacházejí ve svalech a v oční sítnici (retině), kde dosahují průměru 5–7  $\mu\text{m}$ . Nejširší kapiláry, označované také jako sinusoidy, jsou například v játrech, dřeni zubů, kostí a v kůře nadledvin. Jejich průměr bývá 12–15  $\mu\text{m}$ . Některé endotelové buňky sinusoid vykazují fagocytární schopnosti. (Čihák 1997)

Kapiláry patří mezi nejdůležitější útvary v lidském těle, přes jejich tenké stěny probíhá veškerá látková výměna v organismu. Na tuto výměnu jsou velmi dobře adaptovány – endotelové buňky tvoří velmi tenkou stěnu, na kterou z vnější stany naléhá tenká *lamina basalis*. (Čihák 1997)

Podle struktury se dělí do čtyř skupin. První je skupina souvislých neboli somatických kapilár. Jejich charakteristickou vlastností je nepřítomnost fenestrací v endotelu. Vyskytují se ve svalech, nervové tkáni, vazivu a exokrinních žlázách. Dalším charakteristickým znakem somatických kapilár jsou pinocytární váčky, ty však nejsou přítomny ve všech zmíněných orgánech. Vyskytují se po obou stranách kapilár svalové tkáně, naopak v kapilárách zásobujících většinu oddílů nervového systému téměř nebo zcela chybí. (Junqueira et al. 1997)

Druhým typem kapilár jsou kapiláry fenestrované čili viscerální. Rozsáhlé fenestrace (submikroskopické póry) ve stěnách endotelových buněk mají uzavřeny ultratenkou blankou zvanou diafragma. Charakteristická je dobře vyvinutá bazální lamina, která se nachází na zevní straně diafragmy. Fenestrované kapiláry se vyskytují v ledvinách, střevech a endokrinních žlázách – tedy všude tam, kde probíhá rychlá výměna látek mezi krví a tkáněmi. (Junqueira et al. 1997, Čihák 1997) Propustnost kapiláry je zde výrazně ovlivněna kromě zpomalení toku krve, jako ve všech ostatních kapilárách, i strukturami molekul v diafragmě. (Čihák 1997)

Třetím typem kapilár jsou kapiláry fenestrované, jejichž otvory neuzavírá diafragma. Vyskytují se v ledvinných těliscích. Mezi endotelem a podocyty se vyskytuje velmi silná bazální lamina. (Junqueira et al. 1997)

Posledním typem jsou tzv. sinusoidy s křivolakým průběhem a nápadně rozšířeným průsvitem. Obsahují velké množství fenestrací, nemají diafragmu a zřetelně zpomalují průtok krve. Jejich charakteristickým znakem je přítomnost makrofágů

a nesouvislá bazální lamina. Vyskytují se v játrech, kostní dřeni a slezině. (Junqueira et al. 1997)

Odlišné bývá též prostorové uspořádání kapilár. Některé přímo navazují na arterioly a následně opět přecházejí ve venuly, jiné tvoří velmi rozvětvené sítě. (Shier et al. 2007)

Na kapiláry navazují postkapiláry čili prevenuly. Mají téměř totožnou stavbu s kapilárami, jsou však širší a místy v jejich stěnách nalezneme buňku hladké svaloviny. Tento rys je charakteristický i pro prekapiláry. Jejich stěny jsou stejně (v některých případech i více) propustné, jako stěny kapilár. Postkapiláry dále přecházejí do venul. (Čihák 1997)

### 3.1.5 Venuly

Jako venuly (žilky) se označují nejtenčí žíly v lidském těle, jejichž stěna se rovněž skládá ze tří vrstev. Histologická stavba se však od arterií a arteriol liší například nepřítomností *membrana elastica interna*. *Tunica intima* tedy obsahuje pouze endotel a tenkou vazivovou subendotelovou vrstvu. Tenká vrstvička hladkých svalových buněk bez elastických vláken tvoří střední vrstvu zvanou *tunica media*. *Tunica adventitia* je složena z vaziva, které zde tvoří poměrně silnou vrstvu. Vyskytují se zde převážně podélně orientovaná kolagenní vlákna. (Čihák 1997)

### 3.1.6 Veny

Žíly se od tepen odlišují především tenčí stěnou, která obsahuje méně hladkých svalových buněk i méně elastické tkáně. (Čihák 1997, Shier et al. 2007) Ta je pro ně dostačující, neboť v nich krev proudí výrazně pomaleji. Není již popoháněna silou srdce, nýbrž závisí na řadě pohybů těla, které ji nepřímo pohánějí. Mezi tyto pohyby patří například dýchací pohyby či pohyby svalů. (Čihák 1997)

Žilní řečiště představuje na mnoha místech v těle rezervní objem krve. Jedná se například o játra, slezinu nebo podkoží. Umožňuje to velikost jeho objemu a pomalý průtok. (Čihák 1997) Rezervní objem krve je důležitý především při úrazech. Pokud totiž dojde ke krvácení, které je doprovázeno poklesem arteriálního krevního tlaku, nervové impulsy sympatiku reflexně stimulují svaly v žilních stěnách, což vede k jejich konstrikcii. Tím do srdce přitéká horní a dolní dutou žílou více krve a krevní tlak je takto udržován. (Shier et al. 2007, Holíbková a Laichman 2004) V žilách se nachází přibližně 70 % celkového objemu krve. (Junqueira et al. 1997)

Žíly se dle umístění v těle dělí na dvě skupiny. Povrchové žíly se nachází v podkožním vazivu, kde zpravidla nedoprovázejí žádné tepny, a místy jsou viditelné pod kůží. Skrze povrchové fascie mají spojky do druhého typu žil, žil hlubokých. Ty doprovázejí tepny a často také nervy. Podél tepen středního kalibru bývají dvě místy příčně propojené žíly. (Čihák 1997)

Tři vrstvy jsou společné pro arterie i veny, v jejich histologické stavbě však existují rozdíly (viz Obr. 1). Stěny žil mají menší relativní tloušťku vrstev a liší se i v poměru zastoupení jednotlivých tkáňových složek. *Membrana elastica interna* se vyskytuje až v žilách středního a většího průměru. *Tunica media* je tenčí než u arterií, nachází se v ní menší množství hladké svaloviny. V některých žilách (jako například v nitrolebečních splavech či v diploických žilách) svalovina úplně chybí. Takové žíly už nemohou regulovat průtok krve a jsou zavzaty do okolního hustého vaziva či do spongiózní kosti. I svalovina největších žil však bývá zredukována. (Čihák 1997)

Žíly mají na rozdíl od arterií ještě další charakteristický znak – žilní chlopně neboli *valvulae venosae*. Jedná se o vazivem vyztužené výběžky *tunica intima*. Pokrývá je endotel a může na nich být vytvořena i *membrana elastica interna*. Mají tvar půlměsíce, jednu až tři kapsy a umožňují průtok krve pouze směrem k srdci. (Čihák 1997) Pomáhají tak jejímu návratu zpět do pravé srdeční síně, v opačném směru jsou uzavřeny. (Shier et al. 2007) Nejvíce se vyskytují v žilách končetin. (Čihák 1997)

### 3.1.7 Hladký sval

Za tonus a motilitu mnoha orgánů v těle odpovídají buňky hladkých svalů. Jedná se o bronchy, žaludek, střeva, vývodné močové cesty, uterus, oko, chánovody a v neposlední řadě i o cévy. (Lüllmann et al. 2002) Hladká svalovina se vyskytuje v arteriích, venách, arteriolách i venulách. Nenachází se pouze v kapilárách. (Trojan et al. 2003)

Hladké svalstvo tvoří skupiny vřetenovitých buněk, na nichž není pod světelným mikroskopem viditelné příčné pruhování. Vlákná aktinu a myosinu v myofibrilách jsou totiž velmi tenká a navíc uspořádaná náhodněji, než je tomu u svalů příčně pruhovaných. (Junqueira et al. 1997, Shier et al. 2007) Buňky jsou protáhlé a zašpičatělé, každá obsahuje jediné centrálně uložené jádro. Postrádají příčné tubuly a nemají příliš vyvinuté sarkoplasmatické retikulum. (Shier et al. 2007)

Podle umístění a funkčních požadavků probíhá jejich kontrakce různou rychlostí. Ta je regulována nervově nebo humorálně. (Lüllmann et al. 2002) Hladká svalovina

přijímá impulsy z adrenergních i cholinergních nervových zakončení, která působí vzájemně antagonisticky. (Junqueira et al. 1997) Oba neurotransmitery pak kontrakci některých hladkých svalů stimulují a jiných inhibují. V cévních stěnách jsou svalová vlákna organizovaná méně než v dutých orgánech a fungují jako samostatné jednotky. (Shier et al. 2007)

Hladká svalovina je velmi diferencovaná, proto nelze ani svalovinu v cévách považovat za jednotnou skupinu. Neliší se pouze mezi arteriemi a venami, nýbrž i v různě lokalizovaných arteriích. (Lüllmann et al. 2002)

### 3.1.8 Kontrakce hladkého svalu

Kontrakce hladkého svalu je závislá především na koncentraci iontů kalcia uvnitř buněk. V cytosolu se nachází za klidového stavu vápenaté ionty v koncentraci  $10^{-7}$  M, zatímco v extracelulárním prostoru jich je 10000× více ( $10^{-3}$  M). Buněčná membrána je pro ionty málo permeabilní, proto se tento gradient snadno udržuje. Pro ionty vápníku je fosfolipidová dvojvrstva dokonce absolutně nepropustná. Aby mohlo dojít k jejich transportu přes membránu, musí v ní být zabudován bílkovinou tvořený kanál. (Lüllmann et al. 2002)

Ke kontrakci svalu dochází po vstupu kalcia do buňky. I uvnitř buňky jsou zásobní místa, ze kterých se může vápník uvolnit – jedná se například o sarkoplasmatické retikulum či o vazebné místo na buněčné membráně. (Lüllmann et al. 2002) Sarkoplasmatické retikulum však není v hladkých svalových buňkách příliš výrazné, proto je nutný vstup vápenatých iontů z extracelulárního prostoru vápníkovými kanály. (Trojan et al. 2003) Podobně jako při kontrakci příčně pruhovaného svalu musí být i u svalu hladkého pro umožnění stahu získávána energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP). (Shier et al. 2007)

V buňkách se vyskytují klasická kontraktilní vlákna – aktin a myosin – nejsou však totožná s kontraktilními vlákny v příčně pruhovaném svaly. Liší se například ve fyziologických vlastnostech, uspořádání, stavbě či v zastoupení jednotlivých kontraktilních bílkovin. (Trojan et al. 2003)

Při zvýšené koncentraci kalcia vznikají v buňkách komplexy vápníku s kalmodulinem. Jedná se o protein, který obsahuje čtyři vazebná místa pro vápenaté ionty a je strukturou příbuzný troponinu, jenž se využívá jako senzor kalcia k aktivaci kontraktilních vláken v příčně pruhovaném svaly. Komplexy vápník–kalmodulin aktivují tzv. light-chain-myosin-kinase (LCMK). Jedná se o kinasu lehkého řetězce myosinu,

enzym, který přenáší na lehké řetězce myosinu fosfátovou skupinu. Kontrakce pak nastává reakcí fosforylovaného myosinu s aktinem. (Lüllmann et al. 2002)

Myosinu se v hladkém svalu vyskytuje třikrát méně než ve svalu příčně pruhovaném a ani jeho stavba není v obou typech shodná. Aktinu je zde naopak dvakrát více. V hladkém svalu se nenachází vysoce uspořádané sarkomery, proto je rozpětí jeho délky mnohem větší než rozpětí délky svalu příčně pruhovaného. Dokáže se zkrátit až na pětinu své klidové délky a rovněž protáhnout se může mnohem více než sval příčně pruhovaný. (Trojan et al. 2003)

K relaxaci dochází poklesem koncentrace vápenatých iontů v cytosolu. Ionty se uloží zpět do zásobních míst, nebo se za účasti  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasy transportují mimo buňku. (Lüllmann et al. 2002) Sarkoplasmatické retikulum je v hladkých svalových buňkách méně vyvinuté, proto je vápník vychytáván i dalšími organelami. Mezi ty patří například mitochondrie. (Trojan et al. 2003) Fosfátové skupiny jsou od lehkých řetězců myosinu odštěpeny fosfatasami a myosin se opět vrací do klidového stavu. (Lüllmann et al. 2002)

#### 3.1.8.1 *Molekulární podstata kontrakce*

Na molekulární úrovni se kontrakce hladkého svalu velmi podobá kontrakci svalu příčně pruhovaného. Dochází k posuvu filament a vznikají příčné můstky mezi aktinem a myosinem. Zároveň musí dojít k hydrolyze ATP, která v hladkém svalu probíhá pomaleji. (Trojan et al. 2003) Také samotná kontrakce a následná relaxace svalu je v hladkém svalstvu pomalejší. Sval zůstává kontrahovaný delší dobu, než je tomu u svalu příčně pruhovaného, za spotřeby stejného množství ATP. (Shier et al. 2007)

Svalová kontrakce je regulována intracelulární hladinou kalcia. Kromě již zmíněných mechanismů ovlivňují hladinu vápníku i regulační proteiny kalmodulin, kaldesmon a kalponin. (Trojan et al. 2003)

#### 3.1.9 **Regulace krevního oběhu**

V oběhovém systému jsou vytvořeny různé regulační mechanismy. Některé zabezpečují místní požadavky na průtok krve, jiné zajišťují fungování oběhového systému jako celku. Periferní cirkulace je řízena dvojitým způsobem – místně (reakcí hladké svaloviny arteriol na místní podněty a podmínky) a centrálně (reakcí hladké svaloviny arteriol na pokyny z ústředí celkových regulačních mechanismů v mozgovém kmeni). Místní regulací je řízen průtok krve jednotlivými tkáněmi a orgány, centrální regulace udržuje stálý tlak krve při změnách průtoku jednotlivými orgány v důsledku změn jejich potřeby prokrvení. (Trojan et al. 2003)

Místní regulační mechanismy (= autoregulace) mění cévní průsvit, a tím upravují průtok krve tkání. Zároveň dochází ke změně celkového periferního odporu v řečišti, což může způsobit změnu krevního tlaku. Celkové regulační mechanismy zabraňují změně celkového periferního odporu i krevního tlaku změnou průsvitu cév v ostatních oblastech kardiovaskulárního systému a úpravou činnosti srdce. Místní řízení převládá v mozku a myokardu, centrální ve splachnické oblasti a v kůži. (Trojan et al. 2003)

Autoregulace zajišťuje především tři požadavky – udržet konstantní průtok krve tkání i při změně TK, udržovat stálou lineární rychlost toku krve a přizpůsobovat průtok krve tkání její metabolické aktivitě. (Trojan et al. 2003)

### 3.1.9.1 *Místní regulační mechanismy*

#### Myogenní autoregulace

Myogenní mechanismus zprostředkovává udržení stálého průtoku krve cévou i při změně TK. Vyšší TK způsobí roztažení cévní stěny, což vede ke kontrakci její hladké svaloviny a zmenšení průsvitu cévy. Zároveň však vzroste i odpor a průtok krve cévou zůstane nezměněn. Tento typ autoregulace se uplatňuje především v ledvinách a v mozku. (Trojan et al. 2003)

#### Endotelová regulace

Pokud se v cévě zvýší lineární rychlost toku krve, endotel vyloučí oxid dusnatý a dojde k vasodilataci. Endotelová regulace brání vzniku příliš vysoké lineární rychlosti proudu krve a rovněž přechodu k turbulentnímu proudění, které by mohlo vést ke vzniku trombu. (Trojan et al. 2003)

#### Metabolická regulace

Každý orgán má svou vlastní regulaci krevního oběhu odvozenou od akutních potřeb dodávky kyslíku a živin a odvodu zplodin metabolismu. Kyslík, další látky nutné pro zajištění metabolismu i vznikající metabolity působí na hladké cévní svaly přímo, nebo přes endoteliální receptory a s nimi spojenou produkci oxidu dusnatého (NO), a ovlivňují jejich tonus. Zároveň zde funguje zpětná vazba – zvýšené prokrvení je důsledkem zvýšení metabolismu daného orgánu. (Trojan et al. 2003)

Tyto mechanismy jsou nejdůležitější v mozku a v srdci. Pro některé žlázy (například v trávicím traktu) je zase typická enzymatická regulace. Při aktivaci žláz v nich

dojde zároveň k výrazné vasodilataci cév. Jedná se především o důsledek působení kininů. Vysoce účinným vasodilatanciem je například bradykinin. (Trojan et al. 2003)

### 3.1.9.2 Celkové regulační mechanismy

Celkové regulační mechanismy zajišťují řízení celkového periferního odporu a minutového srdečního výdeje za účelem neustálého udržování tlakového gradientu nutného pro udržení toku krve v cévách. Tyto mechanismy udržují především stálý arteriální TK při různé redistribuci minutového srdečního objemu. (Trojan et al. 2003)

#### Nervové regulační mechanismy

Mezi rychlými regulačními mechanismy převažují regulační mechanismy nervové, jejichž hlavním úkolem je udržovat stálou hodnotu TK. Ovlivňují i místní průtok krve, jsou však řízeny centrálně. Typické jsou například pro kůži, kosterní svalstvo, ledviny a splachnickou oblast. Zprostředkovává je vegetativní nervový systém, především sympatikus s neurotransmiterem noradrenalinem, který má vasokonstriční účinek. Kromě působení sympatiku se ale v některých oblastech uplatňuje i vasodilatační účinek cholinergních zakončení parasympatiku. (Trojan et al. 2003)

Důležitými mechanismy, které pomocí sympatiku řídí hodnotu TK, jsou cévní reflexy. Informace jsou do vasomotorických center v prodloužené míše doručovány aferentními drahami z četných receptorů, do srdce a hladkých cévních svalů pak přicházejí drahami eferentními. Patří sem například baroreceptorové reflexy a reflexy zprostředkované předsíňovými receptory či chemoreceptory. (Trojan et al. 2003)

#### Hormonální regulační mechanismy

Mezi nejdůležitější hormony, které působí na periferní cévy, patří katecholaminy adrenalin (působí na  $\alpha$ - i  $\beta$ -receptory) a noradrenalin (působí pouze na  $\alpha$ -receptory). Reakce hladkého svalstva na jejich působení je pak závislá na typu receptoru. (Trojan et al. 2003)

Adrenergní receptory se dělí na  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  a  $\beta_2$ , přičemž receptory  $\alpha_2$  se v oběhové soustavě prakticky nevyskytují. Receptory  $\alpha_1$  se nacházejí především v hladké svalovině rezistenčních cév (v kůži, ledvinách a splachniku v místech inervace sympatikem). Receptory  $\beta_1$  se vyskytují v srdci, receptory  $\beta_2$  především v cévách (hlavně ve věnčitých cévách a v kosterním svalstvu). (Trojan et al. 2003)

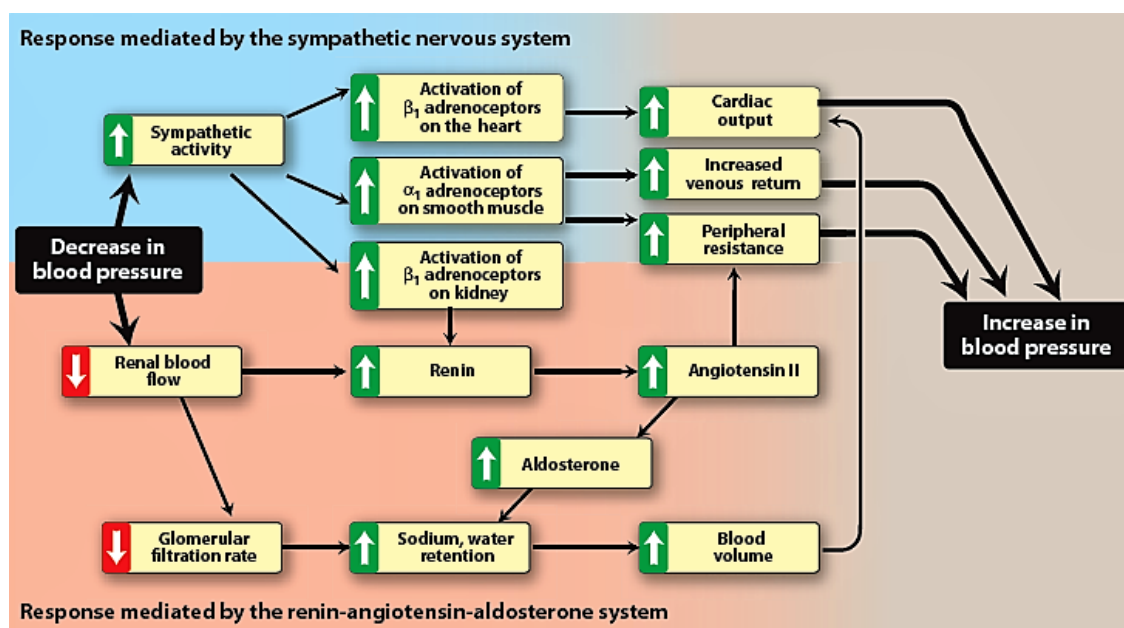


Aktivováním  $\alpha_1$ -receptorů dojde k vasokonstrikci, aktivací  $\beta_2$ -receptorů naopak k vasodilataci. Z toho vyplývá, že noradrenalin způsobuje vždy vasokonstrikci, zatímco adrenalinem je vasokonstrikce vyvolaná u cév, ve kterých převažují  $\alpha$ -receptory, ale v místě převažujících  $\beta$ -receptorů způsobí vasodilataci. Pro dosažení aktivace  $\beta$ -receptorů je však zapotřebí menší koncentrace adrenalinu, než je tomu u  $\alpha$ -receptorů. Adrenalin tedy způsobuje působením na  $\beta$ -receptory pokles celkového periferního odporu a ovlivněním  $\alpha$ - i  $\beta$ -receptorů současnou redistribucí minutového srdečního objemu, zároveň však působí i na myokard, kde minutový srdeční objem zvyšuje. Noradrenalin působí pouze zvýšení celkového periferního odporu, a tím i TK. (Trojan et al. 2003)

Buňky endotelu produkují vasokonstrikčně působící látku endotelin. Ten zároveň působí pozitivně inotropně a pozitivně chronotropně i na srdce. Je tedy na hranici mezi místními a celkovými regulačními mechanismy. (Trojan et al. 2003)

Na hranici mezi rychlými a pomalými regulačními mechanismy zase stojí renin-angiotensin-aldosteronový systém (RAAS), který zapojuje do řízení krevního tlaku i ledviny (viz Obr. 3). Oktapeptid angiotensin II, který je součástí tohoto systému, vykazuje velmi silný vasokonstrikční účinek (především v oblasti arteriol), aktivuje sympatikus a stimuluje sekreci aldosteronu. Tento mechanismus je aktivován při poklesu průtoku krve ledvinami. Pokud dojde ke snížení tlaku ve *vas afferens*, začne se ve zvýšené míře vylučovat renin, což aktivuje celý systém. Výsledná vasokonstrikce vede ke zvýšení TK a zároveň k normalizaci tlaku ve *vas afferens*. (Trojan et al. 2003)

Opačný účinek má tzv. atriální natriuretický peptid, který je vylučován srdečními předsíněmi při zvýšeném žilním návratu. Působí antagonisticky k různým vasokonstrikčním látkám a snižuje tak hodnotu TK. (Trojan et al. 2003)



**Obr. 3** Odpověď autonomního nervového systému a renin-angiotensin-aldosteronového systému na snížení krevního tlaku

Převzato z: Clark et al. (2012)

### Pomalé (dlouhodobé) regulační mechanismy

Pomalé regulační mechanismy působí prostřednictvím řízení celkového objemu krve. Patří sem účinek množství tekutiny vyloučené ledvinami, mechanismus zprostředkovaný vasopresinem (= antidiuretický hormon, který vyvolává vasokonstrikci a zvyšuje zpětnou resorpci vody v ledvinných tubulech) či mechanismus zpětné resorpce sodných iontů a vody způsobený vylučováním aldosteronu. Aldosteron navíc zvyšuje citlivost hladkých cévních svalů na angiotensin II, čímž zároveň posiluje účinnost RAAS. (Trojan et al. 2003)

## 3.2 Flavonoidy

### 3.2.1 Obecná charakteristika

Flavonoidy (deriváty 2-fenylchromanu) se vyskytují ve velkém množství rostlin. (Spilková et al. 2016) Pro rostliny jsou velmi důležité – vábí opylovače a symbionty a chrání rostlinu před škodlivým ultrafialovým zářením, mikroby i býložravci. (Dixon a Pasinetti 2010) Jedná se o rostlinné pigmenty syntetizované z fenylalaninu, které si lidské ani zvířecí tělo není schopno samo vytvořit. Způsobují zbarvení kvetoucích

částí rostlin, v potravě jsou zodpovědné za barvu a chuť. Také snižují oxidaci tuků a chrání vitaminy a enzymy. Jsou teplotně stabilní, ale vaření a smažení je deaktivuje. (Yao et al. 2004)

Prospěšné jsou nejen rostlinám, nýbrž i lidskému tělu. Jedná se o přírodní antioxidanty, které chrání tkáň před oxidačním poškozením a pomáhají tak zmenšovat riziko onemocnění způsobeného působením reaktivních radikálů na důležité molekuly. Volné radikály napadají například lipidy, ribonukleové kyseliny či proteiny. (Volf a Andrs 2015)

Jejich strukturu tvoří dva substituované benzenové kruhy A a B a pyranový kruh C kondenzovaný s kruhem A. (Volf a Andrs 2015) Dělí se na flavony, flavanony, flavonoly, dihydroflavonoly, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly, aurony a chalkony (viz Obr. 4). Tyto skupiny se mezi sebou liší stupněm oxidace pyranového kruhu. Biogeneticky jsou s nimi příbuzné také anthokyany a isoflavonoidy (deriváty 3-fenylchromanu). (Spilková et al. 2016)

V přírodě jsou flavonoidy velmi rozšířené, vyskytují se především v cévnatých rostlinách. Popsáno bylo přes 4000 látek. Odlišnosti mezi jednotlivými flavonoidy tvoří počet a poloha substituentů, které jsou navázány na obou aromatických kruzích, a rovněž napojení cukrů nebo organických kyselin. Za nejvýznamnější flavonoidy jsou považovány flavony, flavonoly, flavanony a katechiny (deriváty flavanu). (Spilková et al. 2016)

V rostlinách se flavonoidy vyskytují především glykosidně vázané. (Spilková et al. 2016) Často bývají navázány v poloze 3 na různých cukrech – mezi nejobvyklejší patří glukosa a rhamnosa. Tvorba glykosidů závisí na přítomnosti světla. Cukr někdy bývá dále acylován různými kyselinami (například benzoovou, gallovou, nebo malonovou). Jejich molekuly jsou tedy velmi pestré. Přítomnost cukrů a hydroxylových skupin zvyšuje rozpustnost ve vodě, methylové skupiny ji naopak snižují. (Volf a Andrs 2015)

Flavonoidy se rozpouští v buněčné šťávě vakuol, proto dříve panoval názor, že jsou pouze odpadním produktem metabolismu rostlin, který je „odklizen“ do centrální vakuoly. (Spilková et al. 2016, Dixon a Pasinetti 2010) Umístění mnoha flavonoidů do vakuoly pak připouští jejich fotoprotektivní a pigmentační aktivitu, nevysvětluje však jejich aktivitu antioxidační. K objasnění funkce flavonoidů, které se hromadí mimo vakuolu (například v chloroplastech či v jádře), je zapotřebí provést ještě několik

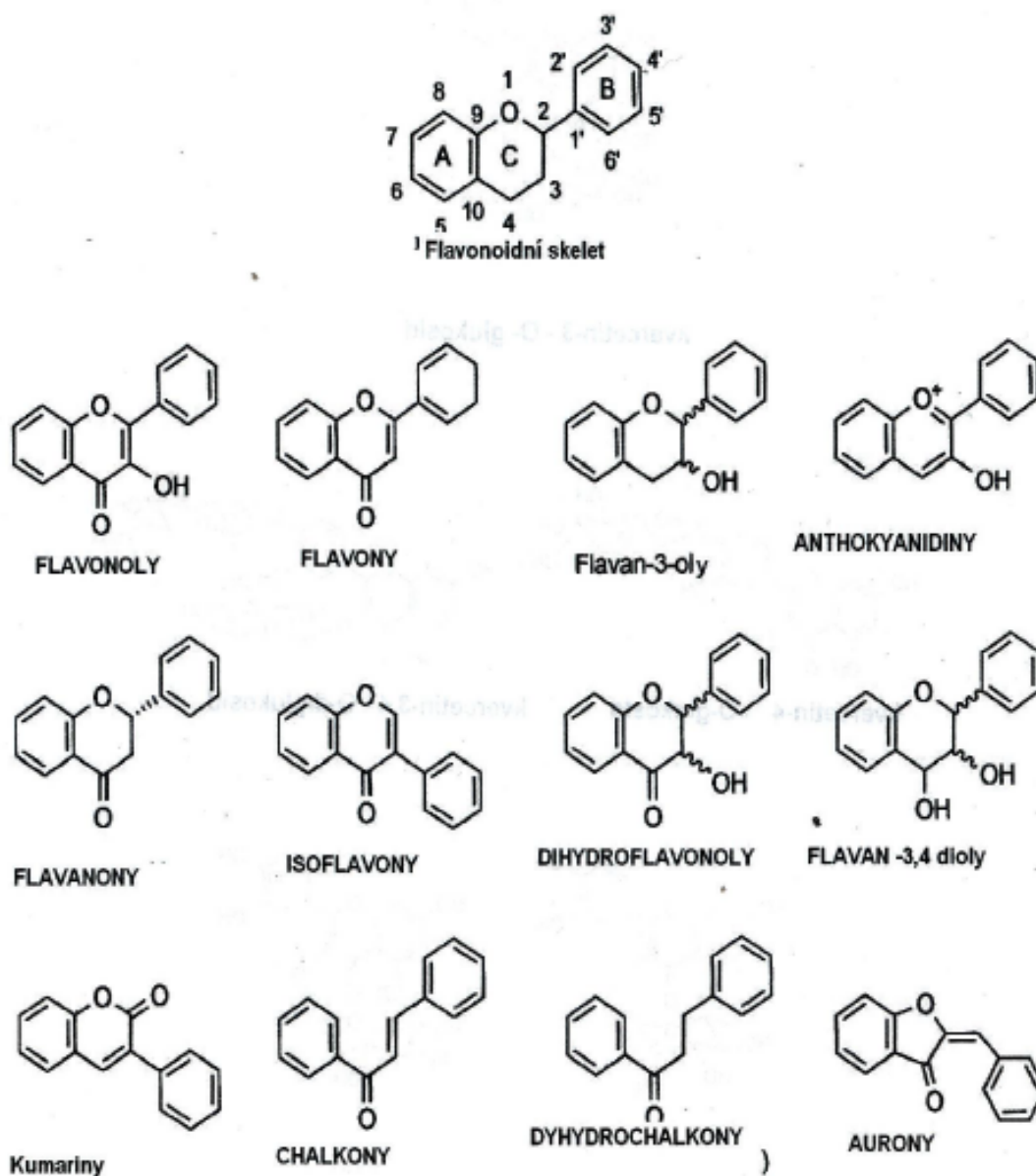
kombinovaných genetických, biochemických a biofyzikálních studií. (Dixon a Pasinetti 2010)

Lipofilní flavonoidy s navázanou methoxylovou skupinou se vyskytují i v silicích. Předpokládá se, že se v živé rostlině účastní oxidačně redukčních pochodů. (Spilková et al. 2016)

Drogy obsahující flavonoidy mají velmi široké využití. Některé z nich normalizují propustnost kapilár, odstraňují jejich lomivost, působí antihemoragicky a antiedematózně – tyto účinky jsou nazývány účinkem vitamínu P. Další flavonoidy dilatují cévy, čímž snižují krevní tlak, jiné působí antiagregačně. Jsou to také významné antioxidanty, které mají schopnost eliminovat volné kyslíkové radikály a další reaktivní formy kyslíku, pokud v organismu dochází k jejich nadprodukci. Inhibují rovněž některé enzymy, jež se účastní biochemických pochodů při vzniku volných radikálů, a dokáží chelátovat měď či železo. (Spilková et al. 2016)

Mezi jejich další pozitivní vlastnosti patří protizánětlivé působení, zábrana oxidace lipidů a v neposlední řadě i důsledků oxidačního poškození při kardiovaskulárním onemocnění, stárnutí organismu či nádorovém onemocnění. Flavonoidy inhibují hyaluronidázu a brání šíření mikrobiálních toxinů tkáněmi. Také potencují účinek kyseliny askorbové (vitamínu C), proto se používají jako podpůrné prostředky k léčbě infekčních nemocí. Mohou podporovat i vylučování a samotnou tvorbu žluči a působit spasmolyticky. Drogy obsahující flavonoidy mají též diuretickou aktivitu. (Spilková et al. 2016)

Účinné jsou nejen glykosidy, nýbrž i jejich aglykony. Jsou používány jako čisté látky, standardizované extrakty i jako samotné drogy. (Spilková et al. 2016)



**Obr. 4** Struktury jednotlivých flavonoidních tříd

Převzato z: Volf a Andrs (2015)

### 3.2.2 Biosyntéza flavonoidů

Rozlišují se dvě hlavní cesty vedoucí k syntéze aromatických látek v biologických systémech. Jedná se o cestu šikimátovou a acetátovou. Těmito dvěma cestami vznikají i aglykony flavonoidních glykosidů. Fenylypropanová jednotka ve formě skořicové kyseliny vázané na koenzym A se během acetátové cesty prodlužuje o řetězec obsahující šest uhlíků. Tento řetězec je polyketidický a přistupují k němu pouze tři molekuly malonylkoenzymu A. Zacyklením vznikne chalkon, ze kterého se později vytváří

flavanony, jež mají vztah k dalším skupinám flavonoidů. Jednotlivé deriváty se vytvoří zavedením či odstraněním hydroxylových skupin. Při zavedení hydroxylové skupiny do polohy 3 vzniknou flavanonoly, flavonoly se vytvoří dehydrogenací poloh 2 a 3. Samotná glykosylace nastává v posledním stadiu tvorby flavonoidu. (Spilková et al. 2016)

### 3.2.3 Významné flavonoidy

Mezi nejvýznamnější flavonoidy patří flavanolový glykosid rutin, jenž byl poprvé syntetizován z rostliny *Ruta graveolens*, podle níž byl i pojmenován. Používá se při žilní nedostatečnosti jako venofarmakum – snižuje permeabilitu kapilár a zvyšuje pevnost stěny cév. Podává se i k doplnění léčby při infekčních onemocněních. (Spilková et al. 2016)

Další významnou látkou patřící do skupiny flavonoidů je v oploді nezralých citrusů se vyskytující hesperidin. Často se kombinuje s vitamínem C při léčbě lomivosti kapilár, hemoragie a hypertenze. Dále se používá ve standardizované směsi s diosminem při chronické žilní a lymfatické insuficienci, k léčbě lymfatických edémů a v neposlední řadě i k léčbě hemoroidů. (Spilková et al. 2016)

Třetím významným flavonoidem, jehož vlastnosti budou popsány dále, je quercetin. Jedná se o jeden z nejrozšířenějších flavanolů. (Spilková et al. 2016)

#### 3.2.3.1 Flavanoly

V přírodě se hojně vyskytují flavan-3-oly. Velké množství jich obsahují čerstvé listy čaje, ve kterých jsou nejvíce zastoupenými polyfenoly. Jedná se například o epigallokatechin-3-*O*-gallát či epikatechin-3-*O*-gallát. Zajímavostí je, že s fermentací čaje klesá obsah gallátových flavan-3-olů až o 90 %. V černém čaji nejsou tedy hlavními složkami tyto látky, nýbrž ve vodě rozpustné vysokomolekulární thearubiginy. (Volf a Andrs 2015)

Mezi další zástupce flavanolů patří katechin a epikatechin. (Volf a Andrs 2015) Nejbohatším zdrojem katechinů je čokoláda a zelený čaj, vyskytují se však i v meruňkách a červeném víně. (Manach et al. 2004) Oba obsahují dvě chirální centra. Mohou být hydroxylovány za vzniku gallokatechinů, nebo esterifikovány s kyselinou gallovou. Potom z nich vznikají gallokatechin, epigallokatechin, nebo již výše zmíněné epigallokatechin-3-*O*-gallát či epikatechin-3-*O*-gallát. (Volf a Andrs 2015)

Po perorální aplikaci se nejrychleji vstřebává (–)-epikatechin, který je nejrozšířenější v přírodě, a dále pak (+)-katechin. Oba jsou biologicky velmi účinné, při úpravě v potravinářství však dochází k epimerizaci (–)-epikatechinu. Ten se pak již málo

akumuluje v plazmě a jeho metabolity se vylučují močí pouze ve velmi malém množství. Přitom jediný (–)-epikatechin má významnou vasodilatační aktivitu. (Volf a Andrs 2015)

### 3.2.3.2 *Flavonoly*

Mezi flavonoly patří flavonoidy vyskytující se především jako *O*-glykosidy. (Volf a Andrs 2015) Jedná se o nejrozšířenější flavonoidy v potravě. (Yao et al. 2004) Bývají substituovány nejen v poloze 3 kruhu C, nýbrž i v dalších polohách. Řadí se sem například quercetin, myricetin, isorhamnetin a kaempferol. (Volf a Andrs 2015)

Nejbohatšími zdroji flavonolů jsou cibule, kadeřavá kapusta, pórek, brokolice, borůvky, červené víno a čaj. (Manach et al. 2004) Jejich hlavní obsahovou látkou je quercetin, v červené cibuli pak nalezneme i anthokyaniny. Bohatým zdrojem jsou i rajská jablka, která obsahují ve větším množství quercetin-*O*-rutinosid. Flavonoly se dále nacházejí v brokolici, jablkách, špenátu či chmelu. Většinou se vyskytují jako konjugáty s mnoha různými cukry. Jejich množství je závislé na podnebí. (Volf a Andrs 2015)

### 3.2.3.3 *Flavony*

Jako flavony se označují flavonoidy, které nejsou oxidovány na uhlíku číslo 3. Patří sem apigenin a luteolin, obsažené v petrželi a v celeru, a dále polymethoxylované flavony tangeretin, nobiletin a sinensetin, které obsahují citrusové plody a oranžádové šťávy. (Volf a Andrs 2015, Manach et al. 2004) Právě polymethoxylované flavony jsou nejvíce hydrofobními flavonoidy. (Manach et al. 2004)

V přírodě nejsou příliš rozšířeny. V rostlinách se většinou vyskytují ve formě svých 7-*O*-glykosidů. (Volf a Andrs 2015) *C*-glykosidy flavonů jsou obsaženy v prosu a pšenici. (Manach et al. 2004)

### 3.2.3.4 *Flavanony*

Flavanony mají neplanární strukturu a chirální uhlík číslo 2. Nejčastěji se vyskytují v citrusovém ovoci, ale také například v rajských jablkách nebo mátě. (Volf a Andrs 2015, Manach et al. 2004) Mezi flavanony patří naringenin a hesperetin, které jsou obsaženy v pomerančích, a eriodyctyol, obsažený v citronech. V plodech bývají glykosylovány v poloze 7 rutinosou, nebo neohesperidosou. Tak vznikají narirutin a hesperidin, jež jsou oba bez chuti a vyskytují se v citrusových slupkách. (Volf a Andrs 2015)

Naringin a neohesperidin jsou konjugáty s neohesperidosou, oba mají intenzivně hořkou chuť. Neohesperidin se vyskytuje v grapefruitových slupkách. Větší část

flavanonů je v pevné části ovoce, absorbují se v tračníku. Mají velmi variabilní individuální bioaktivitu. Pomerančová šťáva příznivě působí na kardiovaskulární nemoci a některé nádory. (Volf a Andrs 2015)

#### 3.2.3.5 *Anthokyanidiny*

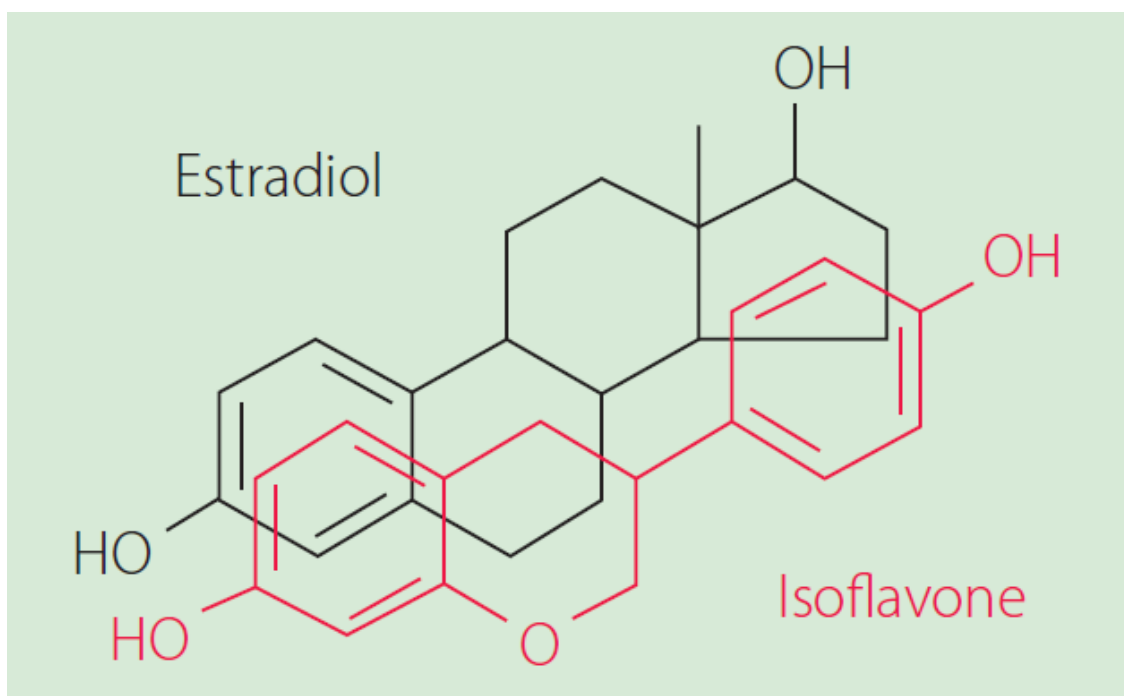
Anthokyanidiny jsou zodpovědné za barvu plodů a květů. (Volf a Andrs 2015) Způsobují oranžové, červené, růžové, modré a fialové zbarvení mnoha druhů ovoce a zeleniny. (Dai a Mumper 2010, Manach et al. 2004) Jsou přítomny například v malinách, jahodách či ostružinách. Maliny a jahody obsahují pelargonidin, ostružiny kyanidin. (Volf a Andrs 2015) Mezi další zástupce patří malvidin a delfinidin. (Volf a Andrs 2015)

V přírodě se nejčastěji vyskytují jako glykosidy (anthokyaniny). Ve víně vzniká v důsledku chemických a enzymatických transformací větší množství polyfenolů odvozených od anthokyaninů. Rostlinné plody navíc mohou obsahovat stejné anthokyanidiny vázané s různými cukry, což ztěžuje zjištění jejich biologické účinnosti. (Volf a Andrs 2015) Vyskytují se v červeném víně, obilí, listové a kořenové zelenině, největší množství se však nachází v ovoci. (Manach et al. 2004)

#### 3.2.3.6 *Isoflavony*

Skupinu isoflavonů tvoří fytoestrogeny genistein, daidzein a glycitein. (Volf a Andrs 2015, Manach et al. 2004) Jsou obsaženy v sóje a v luštěninách jako glykosidy i aglykony. Další isoflavon, 5,7-dimethoxyisoflavon, se nachází v angreštu. Jejich působení se podobá působení ženského pohlavního hormonu estradiolu. Váží se na jeho receptory a díky podobné struktuře (viz Obr. 5) potlačují růst nádorů prsu a prostaty. (Volf a Andrs 2015)





**Obr. 5** Porovnání struktury endogenního a exogenního estrogenu

Převzato z: Kašparová (2013)

### 3.2.3.7 Proanthokyanidiny

Proanthokyanidiny jsou v rostlinách nejrozšířenějšími oligomery a polymery. Obsahuje je například kakao, víno a ovoce. (Volf a Andrs 2015) Jsou známy i pod pojmem kondenzované taniny. (Manach et al. 2004)

Ve střevech jsou depolymerizovány na monomerní či dimerní prokyanidiny. (Volf a Andrs 2015) Prokyanidin reaguje s glykoproteinem ve slinách, čímž přispívá ke kyselé a svíravé chuti ovocných džusů, ovoce (grapefruit, jablko apod.) a nápojů (víno, čaj, pivo apod.). (Dai a Mumper 2010, Manach et al. 2004) Rovněž způsobují hořkou chuť čokolády. (Manach et al. 2004) V plazmě se vyskytují monomery především jako konjugované metabolity. Obtížně se vstřebávají, neboť jsou ve značné části ireverzibilně vázány k makromolekulám v trávicím traktu. Také proto mají nízkou biologickou aktivitu. (Volf a Andrs 2015)

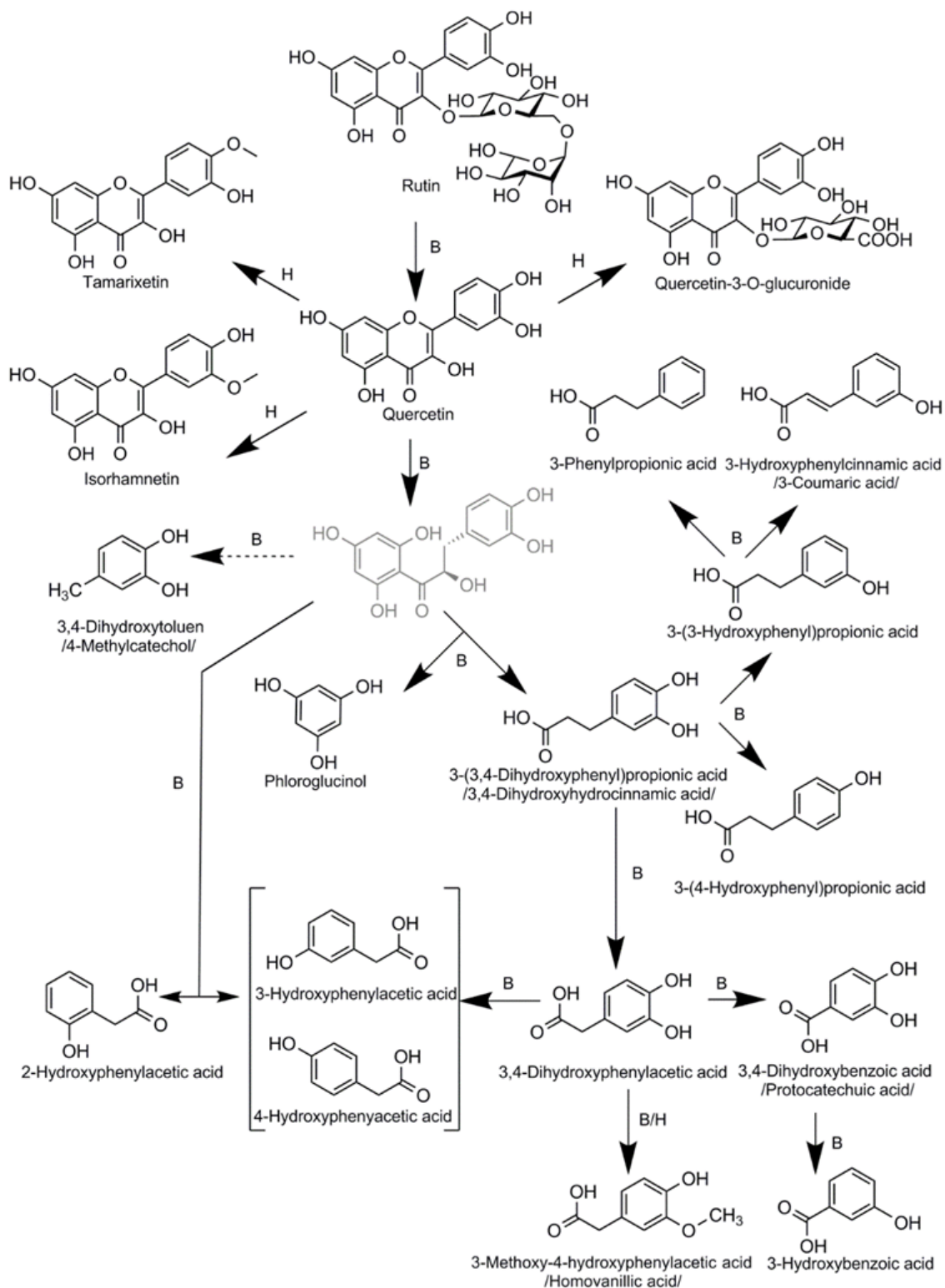
### 3.2.4 Quercetin

Rostlinný flavonol quercetin je v přírodě velmi rozšířený. (Volf a Andrs 2015) Jedná se o flavonoid, který ve své molekule obsahuje ketonický kyslík. (Andriantsitohaina et al. 2012) Důležité jsou jeho farmakologické vlastnosti – působí antiflogisticky, antioxidačně (je silným zhášecem volných radikálů), protinádorově a také

se uplatňuje v léčbě různých nemocí způsobených vyšším věkem. Jeho nevýhodou je však špatná rozpustnost ve vodě a nízká biodostupnost. (Volf a Andrs 2015, Andriantsitohaina et al. 2012) Vstřebává se pomalu a v ne příliš velkém množství, má špatnou permeabilitu a je nestabilní. (Volf a Andrs 2015)

Perorálně podaný quercetin je značně metabolizován ještě před vstupem do krevního řečiště. Biotransformace probíhá v GIT a játrech (viz Obr. 6). Kyselé prostředí žaludku sice neusnadňuje uvolnění quercetinového aglykonu z glykosidového komplexu, toto uvolnění však může být zprostředkováno gastrointestinálními enzymy. (Graf et al. 2006) Při zlepšení těchto vlastností by mohl patřit mezi přední terapeutika používaná na léčbu některých lidských nemocí. (Volf a Andrs 2015) Jeho třemi hlavními metabolity jsou quercetin-3-glukuronid, quercetin-3'-sulfát a isorhamnetin-3-glukuronid. (Andersen a Markham 2006)

Hlavním zdrojem quercetinu je černý bez, dále se vyskytuje v kakau, mexickém oreganu a hřebíčku. (Andriantsitohaina et al. 2012) Nalezneme ho i v rakytníku, květech jírovce, poupatech jerlínu a také v cibuli, brokolici a jablkách. (Korbelář a Endris 1968, Dai a Mumper 2010, Graf et al. 2006) Nižší koncentrace quercetinu se vyskytuje v ořeších, šalotce, brusinkách a červeném víně. (Volf a Andrs 2015)



**Obř. 6** Metabolická přeměna quercetinu (H – metabolity tvořené lidskými enzymy, B – metabolity tvořené mikrobiální flórou v tlustém střevě)

Převzato z: Najmanová et al. (2016)

### 3.2.5 Flavonoidy a lidské zdraví

Dle výsledků mnohých epidemiologických studií a metaanalýz provedených ke konci 20. století bylo potvrzeno, že dlouhodobá konzumace stravy bohaté na rostlinnou složku chrání lidský organismus proti chronickým nemocem. (Andersen a Markham 2006) Hlavním zdrojem flavonoidů v lidské stravě jsou ovoce, zelenina, čaj a víno. (Yao et al. 2004) Kromě toho se rostlinné fenoly vyskytují rovněž v obilovinách, olivách, luštěninách, čokoládě, kávě a pivu. (Dai a Mumper 2010)

Značná pozornost jim je věnována kvůli jejich příznivému antioxidačnímu účinku. Jsou účinné v prevenci lidských onemocnění (kardiovaskulárních nemocí či rakoviny) a působí rovněž na žaludeční a duodenální vředy, alergie, fragilitu cév a virové či bakteriální infekce. Některé mají dokonce potenciál působit proti viru HIV, u dalších byla zaznamenána antialergická, protizánětlivá a antiproliferativní aktivita. (Yao et al. 2004) Výzkum prováděný na potkanech ukazuje, že flavanoly také zpomalují absorpci cholesterolu. (Andersen a Markham 2006)

Kromě toho se v *in vitro* studiích ukázalo, že také reagují s chlornanem, nejsilnějším volným radikálem, který produkují aktivované fagocyty. To znamená, že by mohly být prospěšné i v léčbě aterosklerózy, při které je chlornan jedním z patogenních působilků. Chlornan se však zřejmě podílí i na patofyziologii zánětlivých střevních onemocnění, revmatoidní artritidy, chronického zánětu či některých druhů rakoviny. Flavonoidy také zabraňují peroxidaci lipidů a oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL). (Firuzi et al. 2004)

Polyfenoly z červeného vína zvyšují v endotelu produkci NO, což vede k relaxaci hladké cévní svaloviny. Podle studie Andriantsitohaina et al. (2012) by tento účinek mohl být využit při hypertenzi, cévní mozkové příhodě nebo při metabolickém syndromu.

NO je plyn vytvořený z L-argininu enzymem NO syntasa. Difusí se dostává k hladkým svalovým buňkám a způsobuje vasodilataci za spotřeby cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP). Dále může difundovat i do lumen cévy a předcházet tak adhezi a aktivaci krevních destiček a adhezi monocytů. Zároveň působí proti expresi protrombotických a proaterosklerotických mediátorů (jako je tkáňový faktor, fyziologický aktivátor koagulační kaskády), adhezi molekul, chemoatraktantům a oxidaci LDL. (Andriantsitohaina et al. 2012)

## 4. CÍL PRÁCE

Cílem předkládané práce bylo:

- zjistit účinky quercetinu a jeho vybraných metabolitů na izolované aortě potkana
- zjistit, zda je účinek účinného metabolitu závislý na přítomnosti endotelu či nikoliv

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použitý materiál

#### 5.1.1 Chemikálie (viz Tab. 1)

**Tab. 1** Použité chemikálie

Název	Vzorec	MW	Výrobce
Urethan	$C_3H_7NO_2$	89,03	Sigma–Aldrich, Německo
Chlorid sodný p.a.	NaCl	58,44	Penta Chrudim, Česká republika
Chlorid draselný p.a.	KCl	74,56	Penta Chrudim, Česká republika
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	$NaHCO_3$	84,01	Penta Chrudim, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	$KH_2PO_4$	136,09	RNDr. Jan Kulich, Hradec Králové, Česká republika
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,47	Penta Chrudim, Česká republika
D-glukosa monohydrát p.a.	$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	198,17	Penta Chrudim, Česká republika
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	$CaCl_2$	110,99	Penta Chrudim, Česká republika
Noradrenalin bitartrát monohydrát p.a.	Neuveden na obalu	337,28	Sigma–Aldrich, Německo
Nitroprussid sodný dihydrát p.a.	Neuveden na obalu	297,95	Sigma–Aldrich, Německo
Acetylcholin jodid p.a.	Neuveden na obalu	273,10	Sigma–Aldrich, Německo
Dimethylsulfoxid	$C_2H_6OS$	78,13	Penta Chrudim, Česká republika

### 5.1.2 Přístroje a pomůcky

1. Laboratorní váhy [Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo]
2. Laboratorní sklo, laboratorní lžička, mikropipety
3. Operační nástroje (operační stolek, nůžky, pean, pinzety)
4. Aparatura na izolované orgány: *Multi chamber tissue bath system* [Experimentia Ltd., Budapešť, Maďarsko] (viz Obr. 7)
5. Tlaková lahev s pneumoxidem (směs 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>) [Linde gas]
6. Vyhodnocovací software: *S.P.E.L. Advanced Kymograph Software SOFT-03-KYMO* [Experimentia Ltd., Budapešť, Maďarsko]



**Obr. 7** Aparatura na izolované orgány

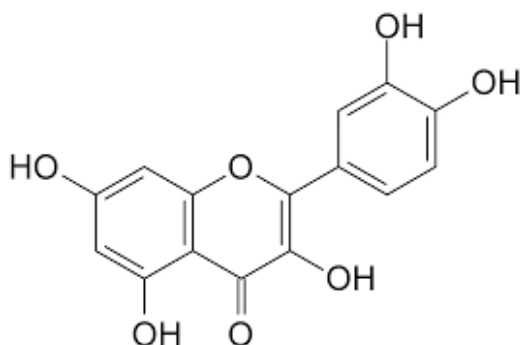
Zdroj: PharmDr. Marie Vopršalová, CSc.

### 5.1.3 Pokusná zvířata

Pro hodnocení účinku quercetinu a jeho metabolitů *in vitro* byli použiti potkani kmene Wistar. Jednalo se o samce s hmotností 400–500 g, kteří byli na Farmaceutickou fakultu Univerzity Karlovy (FaF UK) dodáni firmou MediTox s.r.o. Konárovice. Před provedením experimentu byla zvířata umístěna do vivária FaF UK, kde se adaptovala po dobu nejméně sedmi dnů. Zde byla chována za standardních laboratorních podmínek a krmena standardní peletizovanou potravou s neomezeným přístupem k pitné vodě.

Pokusy probíhaly v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a se souhlasem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

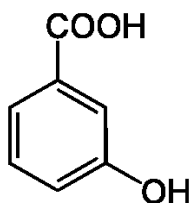
### 5.1.4 Látky testované na izolované aortě



#### Quercetin

MW = 338,26

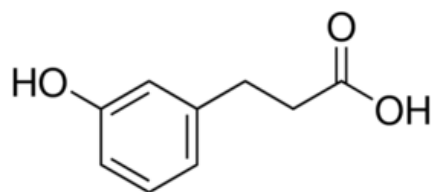
Sigma–Aldrich (Německo)



#### 3-hydroxybenzoová kyselina

Sigma–Aldrich (Německo)





### **3-(3-hydroxyfenyl)propionová kyselina**

Toronto Research Chemicals (Kanada)

## **5.2 Příprava Krebsova živného roztoku**

Živný roztok použitý k provedení experimentu byl připraven jednotlivým rozpuštěním navážených chemikálií (viz Tab. 2) v destilované vodě a následným smísením jejich roztoků. Roztok chloridu vápenatého jsme přidali jako poslední do téměř hotového roztoku, abychom zabránili vysrážení slabě rozpustných vápenatých solí. Nakonec jsme roztok doplnili destilovanou vodou na konečný objem.

**Tab. 2** Složení Krebsova živného roztoku

<b>Chemikálie použité k přípravě živného roztoku</b>	<b>Koncentrace [g/l]</b>
Chlorid sodný p.a.	5,54
Chlorid draselný p.a.	0,35
Hydrogenuhličitan sodný p.a.	2,10
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a.	0,16
Síran hořečnatý heptahydrát p.a.	0,29
D-glukosa monohydrát p.a.	2,10
Chlorid vápenatý bezvodý p.a.	0,28

## 5.3 Metodika

K provedení experimentu byla použita metodika izolovaných cévních kroužků z thorakální části aorty potkana.

### 5.3.1 Zjišťování vasodilatačního účinku quercetinu a jeho metabolitů

Na začátku experimentu byla zvířeti podána anestezie v podobě intraperitoneální injekce urethanu (1,2 g/kg). Potkan byl následně zafixován na operační stůl a vykrven. Preparace thorakální části aorty začala odstrižením kožní řasy v oblasti hrudníku, po kterém následovala tupá preparace, kdy došlo k obnažení a uvolnění části aorty a jejímu následnému oddělení od okolní tkáně. Tímto postupem se získal asi dvoucentimetrový úsek aorty, který byl následně přenesen na Petriho misku do Krebsova živného roztoku, kde byla céva očištěna od krve a zbytků okolní tkáně.

Následně byla aorta nastříhána na segmenty o délce přibližně dva až tři milimetry. Každý připravený kroužek se pak pomocí dvou háčků z nerezové oceli s navázanou ligaturou připevnil na držák tkáně a zavěsil do Schulerovy nádoby na izolovaný orgán. Ta byla předem naplněna Krebsovým živným roztokem temperovaným na 37 °C. Aby bylo zajištěno přežití tkáně, musel být roztok zároveň saturován směsí 95 % kyslíku a 5 % oxidu uhličitého, tzv. pneumoxidem.

Jednotlivé kontrakce a relaxace hladkého cévního svalu byly zaznamenávány počítačem vybaveným speciálním softwarem (*S.P.E.L. Advanced Kymograph Software*) spojeným s aparaturou *Multi chamber tissue bath system*. Před umístěním aortálních kroužků do Schulerovy nádoby byla provedena kalibrace přístroje.

Před samotným zahájením pokusu se preparát zatížil hmotností dva gramy a nechal se 45 minut stabilizovat. Během této doby byl vždy po dvaceti minutách proveden výplach Krebsova živného roztoku. Následně se do lázně aplikovalo přesně pět mililitrů tohoto roztoku a po ustálení křivky na monitoru byl preparát připraven k zahájení podávání látek.

K navození kontrakce byl k preparátu přidán noradrenalin (NORA). Použilo se 50  $\mu$ l 1mM roztoku, výsledná koncentrace v lázni pak byla 10  $\mu$ M. Následovala 45 minut dlouhá stabilizace, po které byl do lázně přidán acetylcholin (ACH) sloužící k ověření, zda je endotel intaktní (50  $\mu$ l o koncentraci 10 mM). Konečná koncentrace dosahovala 100  $\mu$ M. U cév, jimž byl ponechán neporušený endotel, došlo působením ACH k relaxaci. Následovala několikanásobná výměna Krebsova roztoku. Po ustálení se opět přidal

NORA (50  $\mu$ l, 1 mM) působící maximální kontrakci a k němu 10 $\mu$ M kyselina askorbová, která zabraňuje jeho degradaci.

Po ustálení prekontrakce noradrenalinem byly do lázně přidávány jednotlivé koncentrace quercetinu rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO). Přidávání probíhalo ve vzestupných koncentracích od 10<sup>-5</sup> do 10<sup>-1</sup> M. Konečné koncentrace látky v lázni potom byly 10<sup>-7</sup> až 10<sup>-3</sup> M. Použitý DMSO dosahoval u účinných látek koncentrace maximálně 0,1 %, u látek s menší odezvou byl potom ke zjištění relaxačního účinku použit maximálně 2% DMSO. Maximální relaxace byla pak vyvolána 10 $\mu$ M nitroprussidem sodným (NTS). Stejný postup byl použit pro metabolity quercetinu kyselinu 3-hydroxybenzoovou a kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou.

Odpověď cévního svalu byla zjišťována po podání každé jednotlivé koncentrace testované látky a následně se vyjádřila v procentech k maximální relaxaci, kterou vyvolal NTS. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism 5. Metodou nelineární regrese byly stanoveny DRC křivky (křivky závislosti na dávce) a hodnoty EC<sub>50</sub> (koncentrace navozující 50% efekt) pro jednotlivé koncentrace testované látky. Hodnoty v DRC křivkách jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  standardní chyba průměru. Pro statistické porovnání byly použity hodnoty EC<sub>50</sub> a 95% konfidenční intervaly.

### **5.3.2 Zjišťování mechanismu účinku quercetinu a jeho metabolitu kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové**

Ověření, zda je účinek účinného metabolitu závislý na endotelu, bylo prováděno na cévě bez endotelu. U těchto aortálních kroužků bylo provedeno mechanické odstranění endotelu jemným třením vnitřního povrchu cévy dentální nití. Stejný postup byl použit v případě quercetinu. K ověření mechanického poškození endotelu bylo provedeno histologické vyšetření námi dodaných vzorků na Katedře biologických a lékařských věd doc. RNDr. Vladimírem Semeckým, CSc. (viz Obr. 11).

## 6. VÝSLEDKY

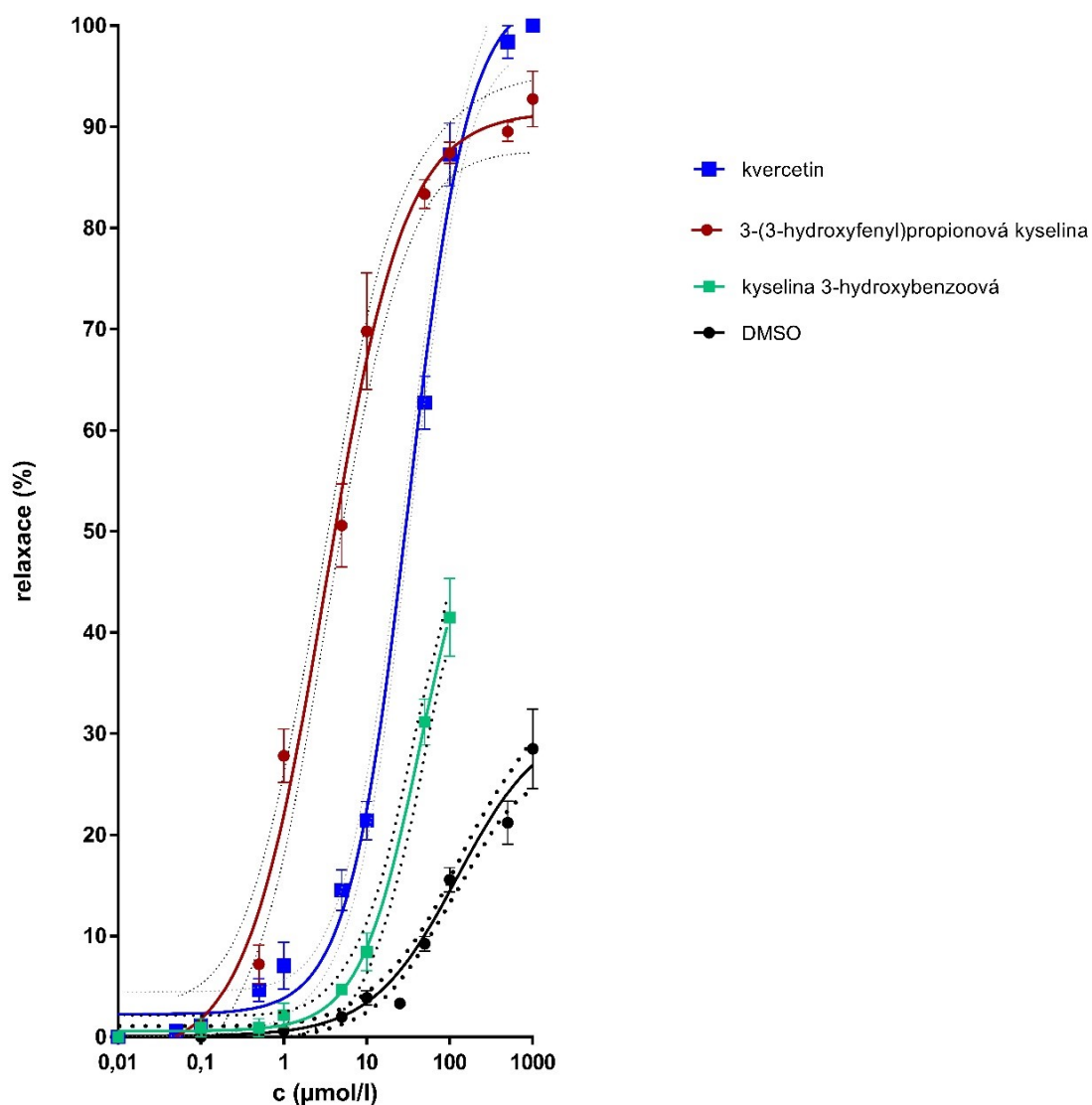
### 6.1 Účinky quercetinu a jeho vybraných metabolitů na izolované aortě potkana

Účinky flavonolu quercetinu a jeho metabolitů kyseliny 3-hydroxybenzoové a kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové byly zjišťovány na izolovaných aortálních kroužcích potkana, u kterých se podáním NORA navodila stabilní a dlouhodobá kontrakce. Endotel v cévě byl intaktní, což prokázala relaxace cévy po podání ACH. Následovala aplikace jednotlivých koncentrací quercetinu a jeho metabolitů, které ve větší či menší míře působily vasodilataci aortálních kroužků.

Stoprocentní relaxace cévy byla navozena pouze po podání quercetinu o koncentraci 100  $\mu\text{M}$ , přesto jsme však jako nejúčinnější látku vyhodnotili kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou (viz Obr. 9). Ta v dávce 100  $\mu\text{M}$  působila až 90% relaxaci a v nižších koncentracích dokonce dosahovala lepších výsledků než samotný quercetin. Už po podání koncentrace 10  $\mu\text{M}$  navodil quercetin pouze 75% efekt, zatímco kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová působila relaxaci o 10 % vyšší. Při koncentraci 1  $\mu\text{M}$  byl pak tento rozdíl ještě výraznější – quercetin relaxoval cévu pouze z 20 %, kyselině 3-(3-hydroxyfenyl)propionové však zůstal 60% efekt. Také porovnání hodnot  $\text{EC}_{50}$  (viz Tab 3) quercetinu ( $3,63 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ), kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové ( $3,21 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ) a kyseliny 3-hydroxybenzoové ( $4,38 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ) jasně dokazuje, že právě kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová je nejúčinnější látkou v našem experimentu.

Naproti tomu kyselinu 3-hydroxybenzoovou za příliš účinný metabolit považovat nemůžeme, v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  dosáhla pouze 40% relaxace. Její hodnota  $\text{EC}_{50}$  je nejvyšší ze všech testovaných látek, což rovněž dokazuje nejmenší účinnost na relaxaci hladkého cévního svalu. Dimethylsulfoxid použitý v experimentu jako rozpouštědlo vyvolal v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  maximálně 25% relaxaci.

Vasodilatační účinky quercetinu a jeho metabolitů kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové a kyseliny 3-hydroxybenzoové v porovnání s rozpouštědlem DMSO jsou znázorněny na Obr. 8. Každý bod na křivce je průměrem minimálně z pěti měření.



**Obr. 8** Účinek quercetinu a jeho vybraných metabolitů na cévu *in vitro*

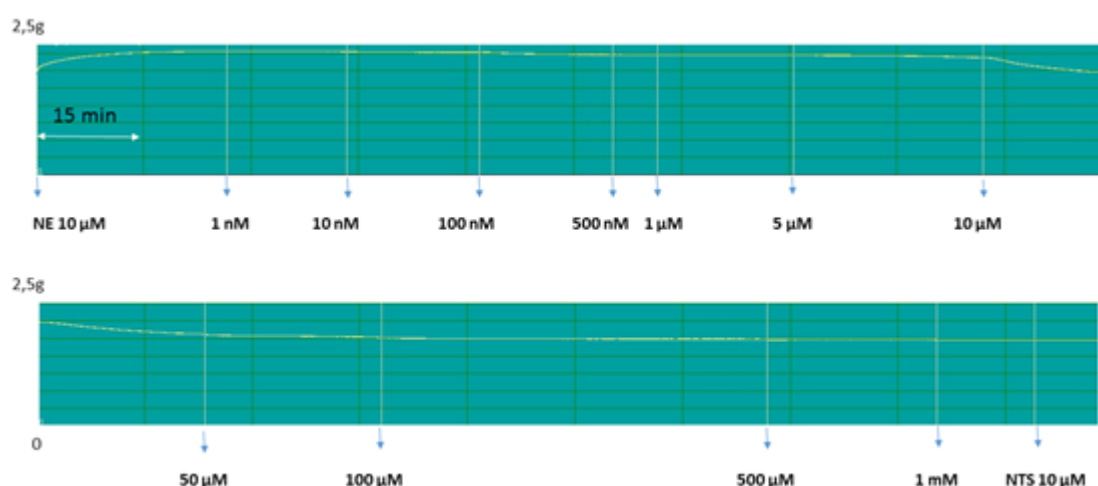
**Tab. 3** Hodnoty  $EC_{50}$  testovaných látek a jejich konfidenční intervaly

Látka testovaná na aortálních kroužcích	$EC_{50}$ [mol/l]	Konfidenční interval 95 %
Quercetin	$3,63 \cdot 10^{-5}$	$3,01 \cdot 10^{-5}$ – $4,37 \cdot 10^{-5}$
Kyselina 3-hydroxybenzoová	$4,38 \cdot 10^{-5}$	$1,91 \cdot 10^{-5}$ – $1,00 \cdot 10^{-4}$
Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová	$3,21 \cdot 10^{-6}$	$2,48 \cdot 10^{-6}$ – $4,16 \cdot 10^{-6}$
Dimethylsulfoxid	$1,22 \cdot 10^{-4}$	$6,73 \cdot 10^{-5}$ – $2,21 \cdot 10^{-4}$

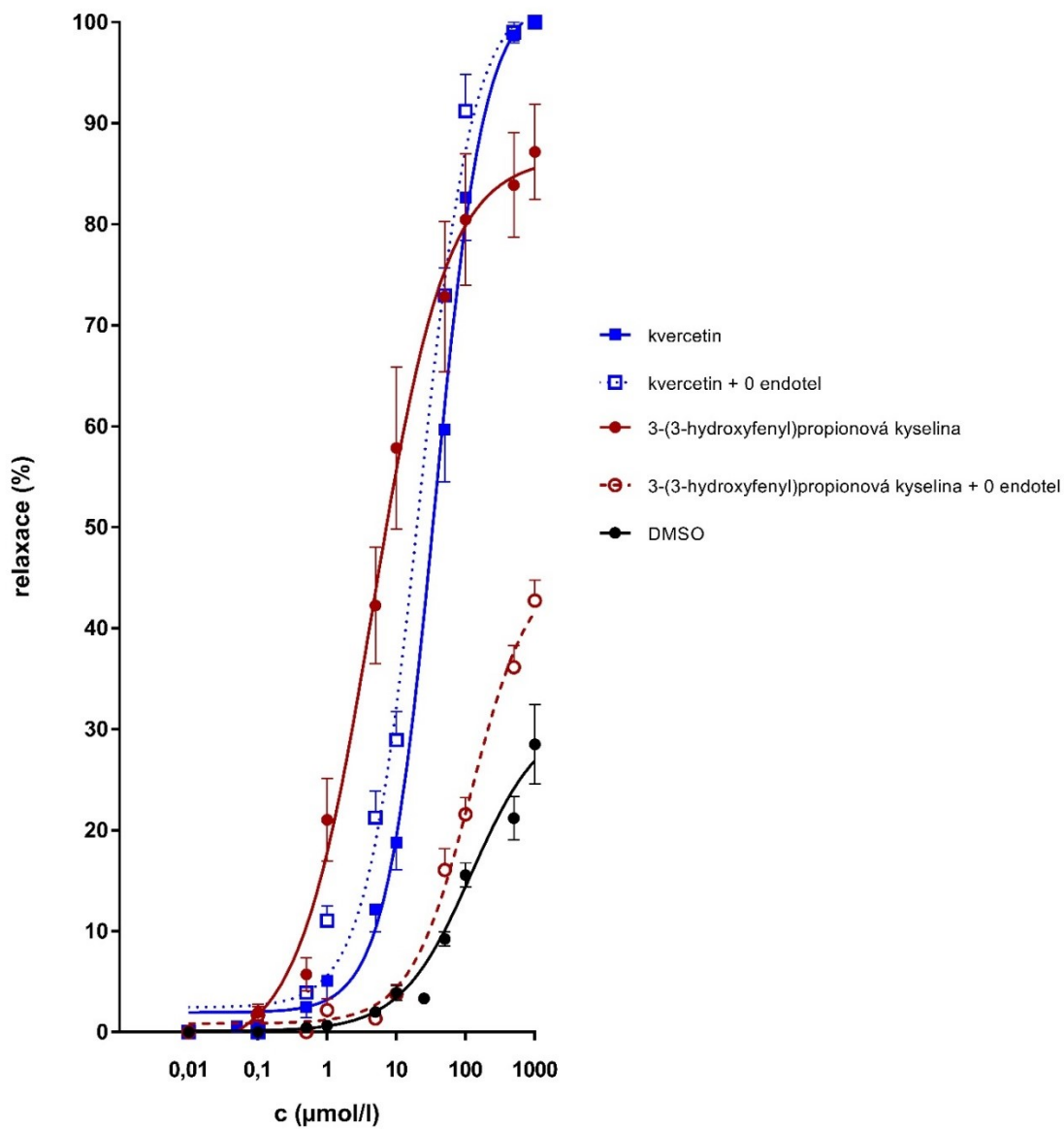
## 6.2 Ověřování mechanismu účinku quercetinu a kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové

Mechanismus účinku (MÚ) quercetinu a jeho účinného metabolitu kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové byl ověřován na cévě po předchozím mechanickém odstranění endotelu.

V případě quercetinu se průběh DRC křivek (viz Obr. 10) znázorňujících jeho účinek na cévu s endotelem a bez endotelu prakticky shodoval. Naopak DRC křivky kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové se významně lišily v závislosti na přítomnosti či absenci endotelu v izolovaném aortálním kroužku. Zatímco u cévy se zachovaným endotelem došlo při aplikaci vzorku o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  k 85% relaxaci, stejná koncentrace vyvolala u vzorku bez endotelu pouze 40% odezvu. 1  $\mu\text{M}$  koncentrace pak způsobila u vzorku s ponechaným endotelem 50% relaxaci, zatímco u vzorku bez endotelu byla odezva minimální.



**Obr. 9** Záznam vasodilatačního účinku kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové (NTS = nitroprussid sodný, NE = noradrenalin)



**Obr. 10** DRC křivky působení quercetinu a kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové na aortu s endotelem a bez endotelu

## 7. DISKUSE

Flavonoidy jsou látky přírodního původu, které se vyskytují v běžné stravě, proto jsou jejich účinky na lidský organismus hojně studovány. Jedním z nejvíce zkoumaných účinků je jejich působení na kardiovaskulární (KV) systém. Popsaný KV efekt je však založen především na *in vitro* experimentech a epidemiologických studiích. (Edwards et al. 2007) Klinické studie byly provedeny pouze pro hodnocení několika málo účinků, jsou však nezbytné pro vyhodnocení působení flavonoidů na lidské zdraví. Bohužel v těchto studiích chybí zejména informace o dávkování a o jejich farmakokinetice. (Gross 2004)

Jedna z dříve provedených studií stanovila pořadí flavonoidů dle jejich účinnosti v navození vasorelaxace. Největší vasorelaxace dosáhly flavony (apigenin a luteolin), následovaly flavonoly (kaempferol a quercetin) a isoflavony (genistein a daidzein). Naopak flavany (katechin a epikatechin) vykázaly účinek ze všech flavonoidů nejmenší. (Si et al. 2013) V rozporu s výše uvedenými výsledky je však studie Ajay et al. (2003), která předkládá výsledky dalších dvou experimentů, kdy v jednom byly vyhodnoceny flavonoly jako účinnější než flavony, ve druhém byla účinnost obou skupin popsána jako rovnocenná (s výjimkou 3,3',4'-trihydroxyflavonu). Přitom ve většině studií chybí informace a nálezy, které se týkají účinků metabolitů flavonoidů.

V rámci našeho experimentu, který byl součástí širšího výzkumu skupiny Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie, bylo tedy zjišťováno působení flavonoidů, konkrétně flavonolu quercetinu a jeho metabolitů kyseliny 3-hydroxybenzoové a 3-(3-fenylhydroxyl)propionové, na hladký cévní sval.

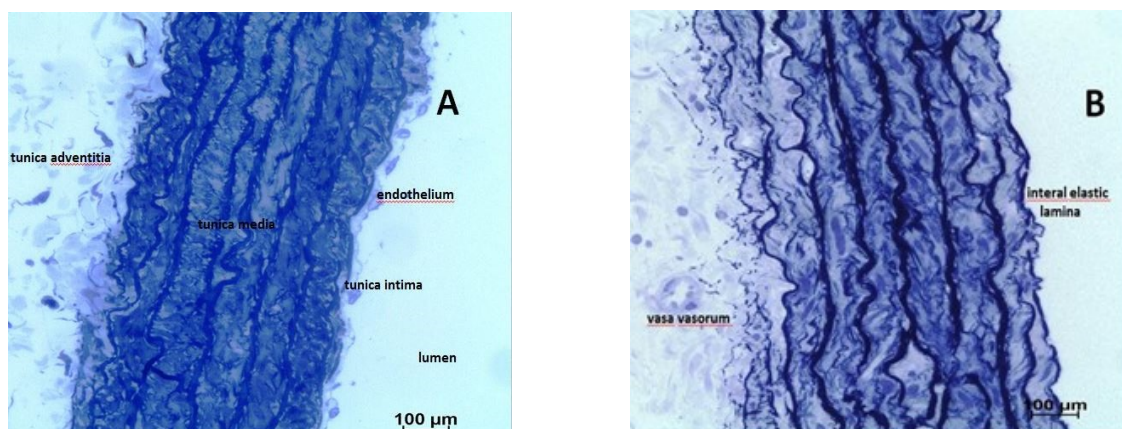
Zásadní a opomíjenou roli v účincích flavonoidů hraje jejich metabolismus, kdy jsou flavonoidy v těle metabolizovány již bakteriální mikroflórou tlustého střeva až na malé fenolické kyseliny, které se snadno vstřebávají a mohou tedy vykazovat farmakologický efekt. Pouze malé množství perorálně podaného quercetinu je absorbováno v nezměněné podobě už v horní části gastrointestinálního traktu (GIT). (Najmanová et al. 2016) Proto jsme na izolovaných aortálních kroužcích potkana *in vitro* zkoumali nejen účinek samotného quercetinu, jenž se hojně vyskytuje v lidské stravě, nýbrž i jeho metabolitů.

Quercetin i oba jeho zkoušené metabolity vykázaly v našem pokusném uspořádání vasodilatační potenciál. Dle výsledků našeho experimentu můžeme za nejúčinnější látku



ze tří testovaných označit metabolit kyselinu 3-(3-hydroxyfenyl)propionovou, naopak druhý testovaný metabolit – kyselina 3-hydroxybenzoová – působil relaxaci izolovaného aortálního kroužku v malém rozsahu a účinný byl až při vyšších koncentracích. Mateřská látka quercetin pak svým účinkem spadala mezi tyto dvě látky, avšak na rozdíl od metabolitů dokázala navodit 100% relaxaci cévy. Těmto nálezům odpovídaly i vypočítané hodnoty  $EC_{50}$ . Metabolit kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová měl ve srovnání s quercetinem mnohonásobně nižší hodnotu  $EC_{50}$  (viz Tab. 3), což dokládá jeho větší účinnost.

Dále jsme zkoumali, zda účinek quercetinu a jeho účinného metabolitu kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové závisí na přítomnosti endotelu v použité cévě. K tomu jsme používali preparáty aorty, které jsme nejprve mechanicky zbavili endotelu. V odborné literatuře se doporučuje odstranit endotel například dřevěnou tyčinkou (Weir et al. 1991, Lemos et al. 2002) či tupou injekční jehlou o velikosti 18 G (Owolabi et al. 2005, Dodd-o et al. 1997), v našem experimentu jsme se však pokusili endotel odstranit šetrněji, a to pomocí silonové zubní nitě, kterou jsme protáhli aortálním kroužkem. Absenci endotelu jsme potvrdili jednak histologicky (viz Obr. 11) a jednak pomocí acetylcholinu, který byl přidáván v koncentraci 100  $\mu$ M k aortálním kroužkům prekontrahovaným noradrenalinem. Preparát bez endotelu na acetylcholin nereagoval vasodilatací.



**Obr. 11** Histologické ověření endotelu

(A – aorta s intaktním endotelem, B – aorta s mechanicky odstraněným endotelem)

Zdroj: doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc., Katedra biologických a lékařských věd

FaF UK

Testovaný quercetin si zachoval svoji účinnost jak u cévy s endotelem, tak u cévy bez endotelu – DRC křivky obou vzorků se prakticky shodovaly. Účinek quercetinu tedy není závislý na přítomnosti endotelu.

Jinak tomu však bylo u jeho metabolitu kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové. Výrazný rozdíl mezi DRC křivkami jasně naznačil, že účinek této látky pravděpodobně bude na přítomnosti endotelu záviset.

Na přítomnosti endotelu však závisí i účinek dalších flavonoidů, například flavonolového glykosidu rutinu. (Lapa et al. 2011) Studie Ajay et al. (2007) zase upozorňuje na skutečnost, že testovaný flavon, jenž nevykazuje antioxidační účinky, v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  působí jak na endotelu závislou, tak i nezávislou relaxaci prekontrahované potkaní arterie. Z toho vyplývá, že mechanismus působení flavonoidů nelze zobecnit a je třeba vždy provést testování pro každou konkrétní látku samostatně včetně zkoumání účinků jejich metabolitů. Vzhledem k tomu, že jsou flavonoidy často a opakovaně přijímány v dietě, mohou mít vliv na krevní tlak jak látky parentní, tak jejich metabolity, a to i v kombinaci, kde by se mohly dokonce uplatňovat jejich aditivní či synergické účinky.

Dle literárních zdrojů i dle našeho experimentu se jedná o látky, které by mohly významně přispět ke snížení krevního tlaku u pacientů s arteriální hypertenzí i dalšími zdravotními komplikacemi. K širšímu využití flavonoidů či jejich metabolitů v terapii však musí být provedeny další studie a především klinická hodnocení, která objasní působení flavonoidů na KV systém člověka a rovněž vyřeší problematiku spojenou s jejich dávkováním.

## 8. ZÁVĚR

V popsaném experimentu byl zkoumán vliv quercetinu a jeho metabolitů kyseliny 3-(3-hydroxyfenyl)propionové a kyseliny 3-hydroxybenzoové na izolované aortální kroužky potkana. Cílem práce bylo zjistit, jak tyto látky na cévu v *in vitro* podmínkách působí a zda je účinek účinného metabolitu závislý na přítomnosti endotelu.

Výsledky pokusu potvrdily, že quercetin i oba jeho metabolity působí relaxaci izolované potkaní aorty (v různém rozsahu) a také že účinek 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny je (na rozdíl od účinku samotného quercetinu) závislý na přítomnosti endotelu v cévě.

Shrnutí výsledků:

- Quercetin v koncentraci 100  $\mu\text{M}$  navodil 100% relaxaci aorty prekontrahované NORA.
- $\text{EC}_{50}$  quercetinu =  $3,63 \cdot 10^{-5}$  M, jeho účinek byl závislý na dávce.
- Kyselina 3-(3-hydroxyfenyl)propionová s  $\text{EC}_{50} = 3,21 \cdot 10^{-6}$  M byla z testovaných látek nejúčinnější, nejmenší účinnost pak vykazala kyselina 3-hydroxybenzoová s  $\text{EC}_{50} = 4,38 \cdot 10^{-5}$  M.
- Na základě grafického vyjádření (DRC křivek) bylo vyhodnoceno, že na rozdíl od quercetinu je účinek 3-(3-hydroxyfenyl)propionové kyseliny závislý na přítomnosti endotelu ve vrstvě *Tunica intima* cévy.

## 9. LITERATURA

1. Ajay M, Achike FI, Mustafa MR. *Modulation of vascular reactivity in normal, hypertensive and diabetic rat aortae by a non-antioxidant flavonoid*. Pharmacological Research 2007;55:385–391.
2. Ajay M, Gilani AH, Mustafa MR. *Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta*. Life Sciences 2003;74:603–612.
3. Andersen ØM, Markham KR, eds. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006:319-370, ISBN 978-0-84932021-7.
4. Andriantsitohaina R et al. *Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols*. British Journal of Nutrition 2012;108:1532-1549.
5. Clark MA, Finkel R, Rey JA, Whalen K. *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*. 5th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer business, 2012:227–242, ISBN 978-1-4511-1314-3.
6. Čihák R. *Anatomie 3*. Praha: Grada, 1997:69–125, ISBN 80-7169-140-2.
7. Dai J, Mumper RJ. *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties*. Molecules 2010;15:7313–7352, ISSN 1420-3049.
8. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MRA, Williamson G. *Human metabolism of dietary flavonoids: Identification of plasma metabolites of quercetin*. Free Radical Research 2001;35(6):941–952, ISSN 1029-2470.
9. Dixon RA, Pasinetti GM. *Flavonoids and Isoflavonoids: From Plant Biology to Agriculture and Neuroscience*. Plant Physiology 2010;154:453–457.
10. Dodd-o JM, Zheng G, Silverman HS, Lakatta EG, Ziegelstein RC. *Endothelium-independent relaxation of aortic rings by the nitric oxide synthase inhibitor diphenyleneiodonium*. British Journal of Pharmacology 1997;120:857-864.
11. Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. *Quercetin Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects*. J. Nutr. 2007;137:2405–2411.
12. Firuzi O, Mladěnka P, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. *Hypochlorite scavenging activity of flavonoids*. JPP 2004;56:801–807, ISSN 0022-3573.

13. Graf BA, Ameho C, Dolnikowski GG, Milbury PE, Chen Ch-Y, Blumberg JB. *Rat Gastrointestinal Tissues Metabolize Quercetin*. J. Nutr. 2006;136:39–44.
14. Gross M. *Flavonoids and Cardiovascular Disease*. Pharmaceutical Biology 2004;42(Suppl 1):21–35, ISSN 174-5116.
15. Holibková A, Laichman S. *Přehled anatomie člověka*. 3. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého, 2004:94–102, ISBN 80-244-0495-8.
16. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Základy histologie*. 7. vydání. Jinočany: H & H, 1997:184–217, ISBN 80-85787-37-7.
17. Kašparová M. *Fytoestrogeny z jetele lučního*. Prakt. Lékáren. 2013;9(4-5):201-203.
18. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic & Clinical Pharmacology*. 12th ed., New York: The McGraw-Hill Companies, 2012:169-191, ISBN 978-0-07-176402-5.
19. Konrádová V, Uhlík J, Vajner L. *Funkční histologie*. 2. vydání, Jinočany: H & H, 2000:115–126, ISBN 80-86022-80-3.
20. Korbelař J, Endris Z. *Naše rostliny v lékařství*. 2. rozšířené a přepracované vydání, Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1968:407.
21. Kumar S, Pandey AK. *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview*. The Scientific World Journal 2013;1–16.
22. Lapa FR et al. *Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from Polygala paniculata L*. JPP 2011;63:875–881.
23. Lemos VS, Côrtes SF, Silva DMR, Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. *Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats*. Br J Pharmacol 2002;135(7):1743–1748.
24. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. *Farmakologie a toxikologie*. 1. české vydání. Praha: Grada, 2002:137–138, ISBN 8071699764.
25. Manach C, Scalbert A, Morand Ch, Rémesy Ch, Jiménez L. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr 2004;79:727–747.
26. Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipický T, Hrdina R. *Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity*. Free Radical Biology & Medicine 2010;49:963–975.

27. Najmanová I et al. *Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats.* Mol. Nutr. Food Res. 2016;60:981–991.
28. Naňka O, Elišková M. *Přehled anatomie.* 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2009:105–118, ISBN 978-80-7262-612-0.
29. Owolabi MA, Jaja SI, Coker HAB. *Vasorelaxant action of aqueous extract of leaves of Persea americana on isolated thoracic rat aorta.* Fitoterapia 2005;76:567–573.
30. Patel JM. *A Review of Potential Health Benefits of Flavonoids.* Lethbridge Undergraduate Research Journal 2008;3(2):1–5, ISSN 1718-8482.
31. Perez-Vizcaino F, Duarte J. *Flavonols and cardiovascular disease.* Molecular Aspects of Medicine 2010;31:478–494.
32. Ritter JM, Lewis LD, Mant TGK, Ferro A. *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 5th ed. Londýn: Hodder Arnold, 2008:185-195. ISBN 978-0-340-90046-8.
33. Rohen JW, Yokochi Ch, Lütjen-Drecoll E. *Color Atlas of Anatomy: A Photographic Study of the Human Body.* 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998:486, ISBN 9780683304923.
34. Shier D, Butler J, Lewis R. *Hole's Human Anatomy & Physiology.* 11th ed. New York: McGraw-Hill, 2007:297–361, 580–648, ISBN 9780073316093.
35. Si H, Wyeth RP, Liu D. *The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation.* Eur J Nutr 2014;53:269–275.
36. Spilková J, Martin J, Siatka T, Tůmová L, Kašparová M. *Farmakognozie.* Praha: Karolinum, 2016:79–176. ISBN 978-80-246-3264-3.
37. Trojan S et al. *Lékařská fyziologie.* 4. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2003:91–109, 179–294, ISBN 80-247-0512-5.
38. Volf K, Andrs F. *Flavonoidy a jejich biologické působení.* Praha, 2015:318.
39. Weir CJ, Gibson IF, Martin W. *Effects of metabolic inhibitors on endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation of rat and rabbit aorta.* Br. J. Pharmacol. 1991;102:162–166.
40. Yao LH et al. *Flavonoids in Food and Their Health Benefits.* Plant Foods for Human Nutrition 2004;59:113–122.