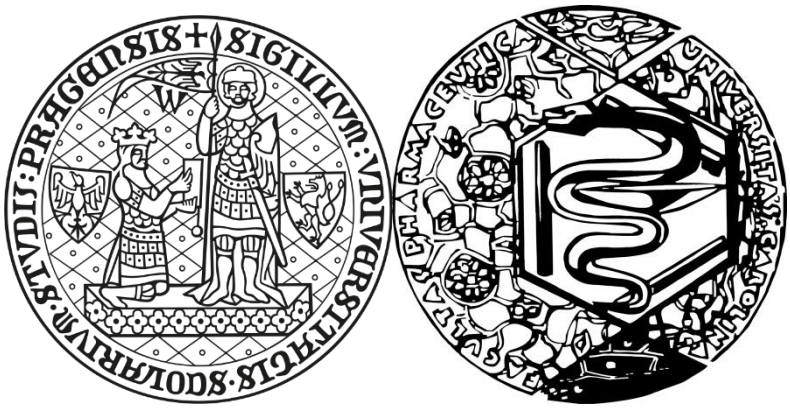
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Protidestičkové účinky 5,7-dihydroxy-4-metylkumarinů

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: Doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové, 2014 Mgr. Michaela Morkusová

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.

Děkuji Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D., vedoucímu mé rigorózní práce, PharmDr. Tomáši Filipskému, Ph.D. a PharmDr. Janě Karlíčkové, Ph.D. za jejich podporu, cenné rady a čas, který mi věnovali při řešení a zpracování této diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Mgr. Michela Morkusová

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

Název diplomové práce: Protidestičkové účinky 5,7-dihydroxy-4-metylkumarinů

Hemostáza je složitý fyziologický proces vedoucí ke spontánní zástavě krvácení z poškozené cévy. Nicméně, v koronárních tepnách poškozených aterosklerózou, zvýšená agregace krevních destiček, s následnou tvorbou trombu, je nejdůležitějším faktorem při vzniku akutního infarktu myokardu.

Protidestičková léčba je základním léčebným postupem v prevenci i léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Současné léčebné postupy jsou schopny snížit kardiovaskulární příhody, ale jsou spojeny se zvýšeným rizikem krvácení a v některých případech u rezistentních pacientů nejsou účinné vůbec. Proto je důležité stále hledat nové protidestičkové léky, které budou mít výhodnější vlastnosti a budou postrádat řadu terapeutických omezení.

V této studii byl analyzován mechanismus protidestičkového účinku u tří 5,7-dihydroxy-4–methylkumarinů, u kterých bylo prokázáno snížení agregace destiček po podání arachidonové kyseliny v podobných koncentracích jako u acetylsalicylové kyseliny (ASA). Proto byly otestovány jejich účinky na třech úrovních agregace navozené uvolněním arachidonové kyseliny.

Žádná z testovaných látek neovlivnila aktivitu tromboxansyntázy, ale všechny kumariny inhibovaly aktivitu cyklooxygenázy-1 a bránily agregaci navozené podáním analogu tromboxanu naznačující tak jejich aktivitu na jeho receptorech nebo na následných úrovních agregace. V inhibici cyklooxygenázy byly 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny dokonce více účinné než ASA. Nejúčinnějším ze zkoumaných kumarinů byl 3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin. Stejná látka vykazovala také největší antagonistický účinek na tromboxanových receptorech.

Závěrem lze shrnout, že testované 5,7-dihydroxy-4-metylkumariny se jeví jako slibní kandidáti na rozšíření stávajícího spektra protidestičkových léků, a to zejména díky jejich účinnosti srovnatelné s ASA a jejich příznivým vlivům na dvě rozdílná místa agregace destiček.

Abstrakt v angličtině

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Michela Morkusová, MSc.

Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Title of diploma thesis: Antiplatelet effects of 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarins

Haemostasis is a complex physiological process which leads to a spontaneous stop of the bleeding from a damaged blood vessel. However, the aggregation of blood platelets followed by thrombus formation in coronary arteries damaged by atherosclerosis is the key risk factor for development of acute myocardial infarction.

The antiplatelet therapy is a basic intervention in prevention and treatment of cardiovascular diseases. The current treatment procedures are able to decrease the occurrence of cardiovascular incidents, but are linked to a higher risk of bleeding and in some resistant cases are not effective at all. Therefore it is important to search for new antiplatelet medications that will have more favourable properties and that will ensure treatment free of many limitations.

This study analysed the mechanism of action of antiplatelet effect in three 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin compounds that were proved to decrease platelet aggregation after application of arachidonic acid in the similar concentration such as acetylsalicylic acid (ASA). On that account we tested their effect on three levels of aggregation induced by release of arachidonic acid.

None of the tested substances influenced the thromboxane synthase activity; however, all of the coumarins inhibited cyclooxygenase-1 and prevented aggregation evoked by application of thromboxane analogue, hence suggesting their activity on its receptors or subsequent levels of aggregation. 5,7-Dihydroxy-4-methylcoumarins were even more potent inhibitors of cyclooxygenase-1 than ASA. The most effective of the tested coumarins was the 3-ethoxycarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin. This

same substance also demonstrated the strongest antagonistic effect on thromboxane receptors.

To conclude, it can be stated that the tested 5,7-dihydroxy-4-methylcoumarins appear to be promising candidates for possible extension of current antiplatelet treatment. This is due to their effectiveness comparable to ASA and their positive influence on two different levels of the platelet aggregation.

SEZNAM ZKRATEK

AA	Kyselina arachidonová (z anglického arachidonic acid)
ADP	Adenosindifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
ASA	Kyselina acetylsalicylová (z anglického acetylsalicylic acid)
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
COX-1	Cyklooxygenáza
DMSO	Dimethylsulfoxid
FXa	Faktor Xa
TxA_2	Tromboxan A_2
PGG_2	Prostaglandin G_2
PGH_2	Prostaglandin H_2
PGI_2	Prostacyklin
PL	Fosfolipidy
PPP	Plazma chudá na destičky (z anglického platelet poor plasma)
PRP	Plazma bohatá na destičky (z anglického platelet rich plasma)
vWF	von Willebrandův faktor

OBSAH

1. ÚVOD 11

2. TEORETICKÁ ČÁST 12

2.1. Hemostáza 12

2.2. Protidestičková léčiva 19

2.2.1. Kyselina acetylsalicylová 20

2.2.2 Inhibitory ADP receptoru - Thienopyridiny 20

2.2.2.1. Tiklopidin 20

2.2.2.2. Klopidogrel 21

2.2.2.3. Prasugrel 21

2.2.2.4. Tikagrelor 21

2.2.3. Dipyridamol 22

2.2.4. Antagonisté receptoru GP IIb/IIIa 23

2.2.4.1. Abciximab 23

2.2.4.2. Eptifibatid 24

2.2.5 Blokátory tromboxanových receptorů a inhibitory tromboxan A_2 syntázy 24

2.2.5.1. Triflusal 24

2.2.5.2. Terutroban 25

2.2.5.3. Pikotamid 25

2.2.6. Kumariny 26

2.2.6.1. 4-methylkumariny 27

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 28

3.1. CÍL PRÁCE 28

3.2. METODIKA 29

3.1.1. Materiál 29

3.1.2. Testované látky 29

3.1.3. Dárci a zpracování krve 30

3.1.4. Stanovení interakce s tromboxanovými receptory 30
3.1.5. Zjištění inhibice tromboxan A_2 syntázy 31
3.1.6. Zjištění inhibice cyklooxygenázy 1 31
3.1.7. Statistická analýza 31
4. VÝSLEDKY 33
5. DISKUZE 38
6. ZÁVĚR 41
7. LITERATURA 42

1. ÚVOD

Protidestičkové léky snižují výskyt tromboembolických příhod a mortalitu. Základním a nejužívanějším lékem této skupiny je kyselina acetylsalicylová. Dosavadní protidestičková strategie u akutních i chronických stavů má závažnou slabinu. Vyskytuje se rezistence, či nedostatečná odpověď na léčbu. Tento problém trápí i klopidogrel, kde navíc bývá problém několikahodinový nástup účinku. Schůdnou a logickou cestou je proto přechod na léčbu účinnějšími přípravky se spolehlivějšími výsledky.

5,7-dihydroxy-4-metylkumariny jsou syntetické kumariny, u kterých byly experimentálně prokázány antiagregační účinky. Navíc se jedná o látky, které mají antioxidační účinky. Vzhledem k těmto zjištěním by se mohlo jedno o velmi slibné kandidáty protidestičkových léků.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Hemostáza

Hemostáza je složitý fyziologický proces vedoucí ke spontánní zástavě krvácení z poškozené cévy (Martínková, 2007). Hemostatická rovnováha je výsledkem normální funkce cévní stěny, krevních destiček a plazmatických faktorů zahrnující systém koagulační, fibrinolytický a jejich inhibitory (Navrátil et al., 2008). Za fyziologických poměrů hemostáza nepoškozuje tok krve v intaktním cévním řečišti. Probíhá v několika fázích.

První fází je reakce cév v místě poranění. Cévní stěna reaguje smrštěním. K vazokonstrikci dochází velmi rychle reflexním způsobem jako odpověď na podnět, kterým je poškození cévy (Michiels, 2003). Tím se v okamžiku poranění zabrání úniku krve z řečiště. Vazokonstrikce je pouze dočasná a trvá krátce, v jiném případě by krev nemohla v daném úseku proudit. Na druhé straně ale i tato krátkodobá vazokonstrikce umožňuje, aby se aktivovaly ostatní systémy (Wu a Thiagarajan, 1996). Vazokonstrikce je ovlivňována tromboxanem A_2 (TxA_2), serotoninem, adrenalinem a fibrinopeptidy (Verhamme a Hoylaerts, 2003). Nejdůležitější složkou z hlediska zástavy krvácení je endotel a subendotelové struktury. Intaktní endoteliální buňky hrají podstatnou úlohu v primární hemostáze, protože udržují trombocyt v intaktním stavu a brání jeho adhezi na cévní stěnu. Aktivaci destiček kontrolují různými mechanismy:

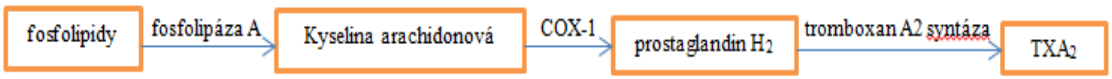
- Vytváří bariéru mezi krví a tkáněmi a oddělují tak od cirkulace vysoce trombogenní subendoteliální vrstvy, zejména struktury na bázi kolagenu
- Syntetizují prostacyklin (PGI_2), který stabilizuje destičku stimulací pomocí cAMP.
- Trvale uvolňují NO, který tlumí aktivaci krevních destiček pomocí cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP).
- Produkují endonukleázy, které přeměňují ADP na neaktivní AMP.
- Vytváří negativní elektrostatický náboj, který nedovolí negativně nabitým trombocytům přilnout k endotelu (Colman, 2006).

Druhou fází je vytvoření destičkové zátky (primární hemostáza), která ucpává drobné trhliny především v mikrocirkulaci. Hlavní roli v této fázi hrají krevní destičky.

Trombocyty (krevní destičky) jsou nejmenší krevní elementy. Mají tvar hladkých disků o průměru 2–4 μm a jsou bezjaderné. Délka jejich života je krátká, 9 - 12 dnů. Počet destiček kolísá mezi hodnotami 130 – 400 * 10^9/l. Hlavním regulátorem jejich tvorby je trombopoetin, hormon tvořený v játrech (Mourek, 2012). Trombocyty vznikají z megakaryocytů v kostní dřeni. Megakaryocyty jsou velké buňky s polyploidním jádrem, které vysouvají své výběžky do sinusoidy kostní dřeně a jejich úlomky se uvolňují do krve. Trombocyty tak nejsou skutečnými buňkami, ale pouze fragmenty cytoplazmy megakaryocytů. Z jednoho megakaryocytu vznikne až 5000 krevních destiček (Slezáková, 2010).

Při porušení kontinuity cévní stěny se obnaží subendotelové pojivo a trombocyty se k němu během několika vteřin přichytí pomocí glykoproteinových receptorů (GP Ia/IIa/IIb a GP Ib/V/IX). Adheze je zprostředkována dvěma specifickými proteiny – kolagenem, jehož vláknité struktury jsou hlavní složkou subendotelu, který silně stimuluje destičky, a von Willebrandovým faktorem (vWF), který je syntetizován cévním endotelem a secernován do plazmy i do subendotelového pojiva, k němuž poutá destičky (Gawaz et al., 2005). Po adhezi nastává fáze aktivace.

Aktivace destiček je zahájena silnými aktivátory – kolagenem, tromboxanem A_2 nebo trombinem. Tromboxan A_2 je syntetizován z kyseliny arachidonové působením enzymu cyklooxygenázy 1 (COX-1). Za normálních podmínek je většina kyseliny arachidonové (AA) vázaná ve fosfolipidové membráně a koncentrace volné AA je nízká. Kyselina arachidonová je odštěpena z fosfolipidů enzymem fosfolipázou A_2 a je dále metabolizována výše zmíněným enzymem COX-1 na prostaglandin H_2 (PGH_2) a z něj se syntetizuje tromboxan A_2 syntázou samotný tromboxan A_2 (Obr.1,).



Obr. 1 – Syntéza tromboxanu A_2. Převzato z Reilly a Fitzgerald, 1993.

V této fázi destičky začnou rychle měnit svůj tvar na kulovitý a vytvoří filopodie (dlouhé a tenké výběžky), pomocí kterých dokonale přilnou k trombogenní ploše a navíc usnadňují agregaci (Trojan, 1993). Aktivované destičky začínají secernovat látky, které podporují adhezi další destiček (vWF), dále se z destičkových granul

uvolňuje adenozindifosfát a tromboxan A_2 (Jackson, 2007). Aktivace destiček tromboxanem A_2 probíhá prostřednictvím G-proteinu a dvou specifických receptorů TP -α a TP-β. Tromboxan/prostaglandinový receptor-α (TP-α) působí přes aktivaci adenylcyklázy, zatímco tromboxan/prostaglandinový receptor-β (TP-β) tento enzym inhibuje. Jedná se o dvě izoformy, které se liší pouze karboxylovým koncem (Hirata et al, 1996). Serotonin a ADP jsou při aktivaci destiček uvolňovány z jejich denzních granul. ADP působí na specifické ADP receptory v membráně destiček. V poslední době byly identifikovány tři různé ADP receptory (Mizuno et al, 2013).

Trombin vzniká na povrchu destiček z protrombinu účinkem protrombinázového komplexu. Komplex je složen z aktivovaného faktoru X (FXa), faktoru V (FVa), který výrazně zesiluje účinek FXa, dále z membránových fosfolipidů a vápenatých iontů. Trombin aktivuje destičky prostřednictvím proteázou aktivovaného receptoru PAR - 1 a působí i na GP Ib. Podle novějších výzkumů trombin působí tak, že odštěpuje extracelulární doménu PAR-1, a tím obnažuje určitou sekvenci této molekuly, která začne sloužit jako ligand receptoru. Obnažený subendotelový kolagen může iniciovat adhezi i u neaktivovaných destiček – v podstatě jako reparační děj. K tomu slouží α_2/β_1 receptory kolagenu. Teprve následná aktivace destičkového glykoproteinového receptoru VI vede k destičkové sekreci, jejich plné aktivaci a k následné agregaci (Bode, 2007). Rovněž cirkulující von Willebrandův faktor se navazuje na obnažený kolagen a zprostředkuje interakci s destičkami prostřednictvím destičkových glykoproteinových receptorů Ib/V/IX. Aktivace destiček jak na receptoru IIb/IIIa, tak i na receptor Ib/V/IX je způsobena vazbou von Willebrandova faktoru. Naproti tomu adheze destiček v místech s denudovavým endotelem a vytvoření monovrstvy adherovaných destiček je zprostředkován pouze vazbou von Willebrandova faktoru na I/V/IX glykoproteinový receptor. Takto zprostředkovaná reparativní adheze probíhá i za úplně terapeutické blokády glykoproteinových receptorů IIb/IIIa nebo u nemocných s Glanzmannovou chorobou (porucha povrchových glykoproteinů IIb/IIIa). Adrenalin působí přes α_2-adrenergní receptor prostřednictvím G proteinu. Dochází k inhibici adenylcyklázy. Výsledkem je především potenciace působení jiných destičkových aktivátorů.

GP IIb/IIIa receptor má doménu intracelulární, transmembranózní část a extracelulární doménu. Extracelulární doména je tvořena 2 řetězci – α a β. Ligandem pro GP IIb/IIIa je fibrinogen, von Willebrandův faktor, vitronektin a fibronektin.

V klidovém stavu destičky má receptor GP IIb/IIIa jen velmi malou afinitu k fibrinogenu. Po aktivaci destičky dochází jednak ke zvýšení povrchové denzity IIb/IIIa receptorů. Tyto receptory jsou uvolňovány jak z α granul, tak z denzních granul. Aktivace IIb/IIIa receptoru je důsledkem konformačních změn jeho dvou extracelulárních ramének. Jde mimo jiné o přeskupení cytoskeletonu, vytvoření pseudopodií, produkci tromboxanu A_2 nebo ovlivnění metabolismu inositolfosfátu. Domény fibrinogenu obsahují sekvence arginin-glycin-aspartát (RGD) a dodekapeptid karboxylové části γ-řetězce se váží na integrinovy receptor IIb/IIIa (Malý, 2004). Vytváří se bílý rozpustný trombus – primární destičková zátka. Primární agregace je děj reverzibilní.

Třetí fáze se nazývá hemokoagulace (srážení krve). Hemokoagulace je tvořena kaskádou enzymových reakcí, jejímž cílem je přeměna fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Dochází k pospojování volně agregovaných destiček v dočasné zátce a vytváří se definitivní sraženina (trombus). Jednotlivé látky (většinou plazmatické bílkoviny vzniklé v játrech), které se v této kaskádě uplatňují, se nazývají koagulační faktory (Langmeier et al., 2009). Koagulační faktory (Tab. 1) jsou označovány římskými číslicemi (I-XIII) v posloupnosti, v níž byly objeveny. Aktivované formy se označují písmenem „a“ (Šlechtová, 2007).

Donedávna byla všeobecně přijímána koncepce hemokoagulační kaskády se dvěma místy iniciace procesu hemostázy označovanými jako zevní a vnitřní cesta. Konečný výsledek obou aktivačních cest byla reakce přeměňující rozpustný fibrinogen na nerozpustná vlákna fibrinu, která společně s destičkami (a ostatními buněčnými elementy krve) vytvářejí stabilní krevní sraženinu. Bylo však prokázáno, že obě dráhy v organizmu nefungují nezávisle, že jsou funkčně propojeny a že zásadní roli hraje tkáňový faktor (TF) z buněčné membrány různých buněk a krevních destiček. Tento model rozděluje hemostázu do fází – iniciace, amplifikace a vytvoření fibrinového koagula působením velkého množství trombinu.

Iniciační fáze hemostázy – se aktivuje kontaktem volně kolujícího faktoru VIIa s tkáňovým faktorem (Mackman, a kol., 2007). Vytvořený komplex TF-VIIa aktivuje za pomoci fosfolipidů (PL) a Ca^{2+} faktor X na aktivní formu Xa. Faktor Xa vstupuje společně s faktorem Va, fosfolipidy (PL) a Ca^{2+} do komplexu zvaného protrombináza.

Tento komplex přeměňuje malé množství protrombinu na trombin (Hoffman a Monroe, 2001). Trombin vzniklý tímto způsobem není schopen rozštěpit dostatečné množství fibrinogenu, ale je schopen zpětně aktivovat koagulační faktory XI, IX, VIII, V a trombocyty (Monroe et al., 2002).

Amplifikační nebo propagační fáze hemostázy - se spouští zpětnými mechanismy. Faktor IXa vytváří s faktorem VIIIa, fosfolipidy (PL) a Ca^{2+} komplex vnitřní tenásu (IXa–VIIa–PL -Ca^{2+}). Po aktivaci faktoru X, dochází již k dostatečné přeměně protrombinu na trombin (Schenone et al., 2004)

Fáze tvorby fibrinového koagula - Trombin štěpí fibrinopeptidy fibrinogenu a uvolňují tak fibrin-monomery, které spontánně polymerují. Kromě toho aktivují faktor XIII, který vzniklou sraženinu stabilizuje vznikem kovalentních vazeb mezi sousedními molekulami fibrin-polymeru. Výsledkem je nerozpustná fibrinová síť (Davie a Kulman, 2006).

Tab. 1 Koagulační faktory

Faktor	**Název** **Alternativní název**
I	fibrinogen
II*	protrombin
III	tkáňový tromboplastin tkáňový faktor
IV	Ca^{2+}
V	proakcelerin, labilní faktor akcelerační globulin
VI	aktivovaný faktor V, tj. Va
VII*	prokonvertin
VIII	antihemofilický faktor (AHF) antihemofilický faktor A antihemofilický globulin (AHG)
IX*	Christmasův faktor plazmatická tromoplastická komponenta (PTC) antihemofilický faktor B
X*	Stuartův-Powerův faktor
XI	plazmatický předchůdce tromboplastinu plasma thromboplastin antecendent (PTA) antihemofilický faktor C
XII	Hagemanův faktor glass faktor
XIII	fibrin stabilizující faktor Lakiho-Lorandův faktor
HMWK	vysokomolekulární kininogen Fitgeraldův faktor
PKK	prekalikrein Fletcherův faktor
	kalikrein
	destičkové fosfolipidy

* vitamin K dependentní

Za fyziologických podmínek je proces koagulace v rovnováze s jeho přirozenými inhibitory. Skládá se ze tří hlavních složek (Esmon, 2001).

1. Inhibitor cesty zevního faktoru (TFPI)
2. Antitrombin (AT III)
3. Aktivovaný protein C (APC)

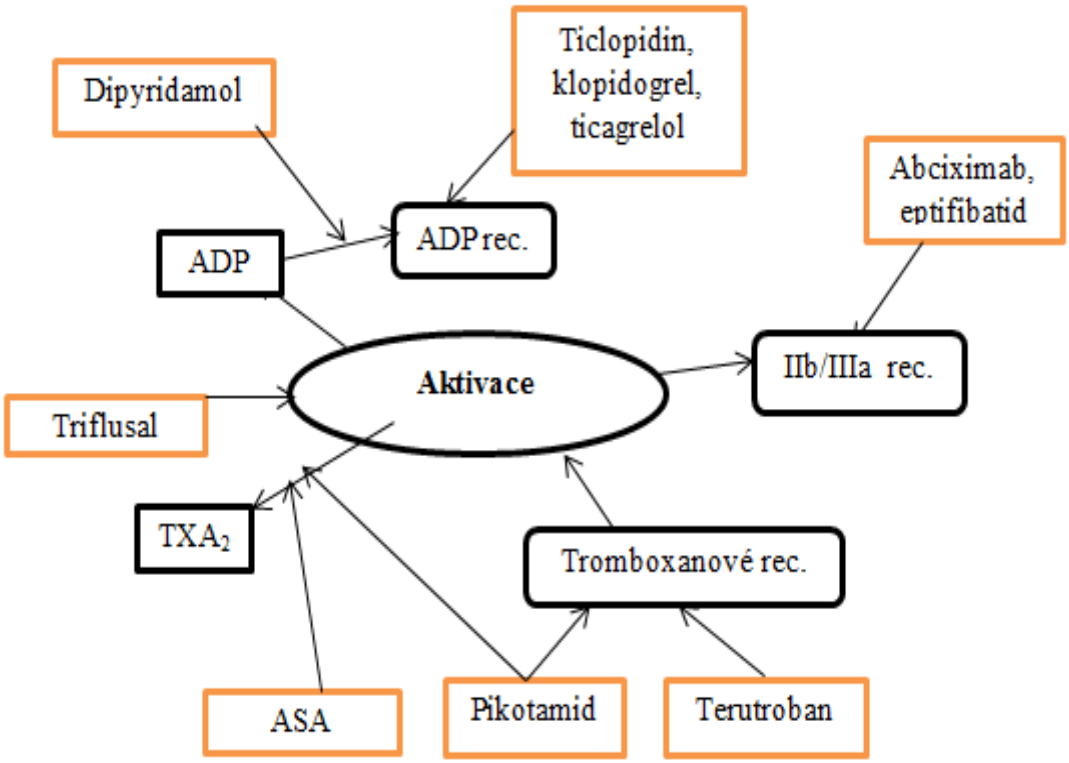
Cílem je kontrola generace trombinu a šíření procesu koagulace mimo místo poraněné cévní stěny. Selhání tohoto systému vede k narušení rovnováhy s trombotickými projevy (Gumulec, 2012).

Fibrinolýza

přirozený proces nutný k rozpouštění fibrinové (hemostatické) zátky. Podstatou je štěpení vláken fibrinu plazminem. Plazmin vzniká proteolytickým štěpením z plazminogenu (Collen a Lijnen, 1991).

2.2. Protidestičková léčiva

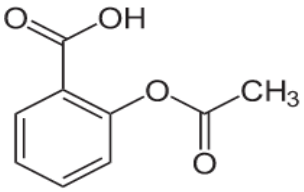
Antiagregační léčba zůstává jedním ze základních sekundárně preventivních léčebných opatření při léčbě komplikací aterosklerózy a musí navazovat na všechna další léčebná opatření (Špác, 2008). Jedná se o využití účinku namířeného proti agregaci krevních destiček při výstavbě primární cévní zátky. Protidestičková léčiva (Obr. 2) mohou zasahovat do různých fází vývoje trombu a jejich mechanismus účinku se tedy navzájem liší, což umožňuje jejich kombinaci (Rang et al, 2007). Základním protidestičkovým lékem zůstává kyselina acetylsalicylová. Mezi další antiagregancia patří látky ze skupiny blokátorů ADP receptorů, inhibitorů glykoproteinu IIb/IIIa, či některé další látky (O´Donnell et al, 2008).



Obr. 2 - Mechanismy účinků protidestičkových léků. Upraveno z Karetová a Bultas, 2009.

2.2.1. Kyselina acetylsalicylová (Acylpyrin, Aspirin, Anopyrin, Godasal)

Kyselina acetylsalicylová (ASA, Obr. 3) ireverzibilně blokuje destičkový enzym cyklooxygenázu-1 (COX 1), který je v organismu odpovědný za syntézu prostaglandinů a tromboxanu (Obr. 1, Patrono et al., 2004). Působící po celou dobu životnosti trombocytu (Stejskal et al., 2001). Léčba by měla být celoživotní. Za optimální dávky se považuje 75 mg – 150 mg denně, u nás obvykle 100 mg. Se zvyšující se dávkou antiagregační účinek nestoupá, ale narůstá riziko krvácivých komplikací a nežádoucích účinků v oblasti gastrointestinálního traktu (Marek et al, 2010).

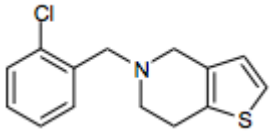


Obr. 3 – Vzorec kyseliny acetylsalicylové.

2.2.2 Inhibitory ADP receptoru - Thienopyridiny

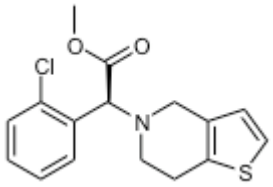
Tyto látky jsou nekompetitivními inhibitory destičkového receptoru $P2Y_{12}$, klíčového receptoru pro ADP. Mají podobné protidestičkové účinky jako ASA (Price, 2009).

2.2.2.1. Tiklopidin (Obr. 4, APO-TIC, Targen) je prvním thienopyridinem užívaným v klinické praxi. V terapeutické dávce (250 mg 2× denně) inhibuje agregaci destiček z 50 až 70 %. Jeho účinek je detekovatelný během dvou dní a maximálního účinku je dosaženo po 5 až 8 dnech. Tiklopidin je většinou nahrazován klopidogrelem, který je bezpečnější a zejména nepůsobí neutropenie (Belej, 2008).



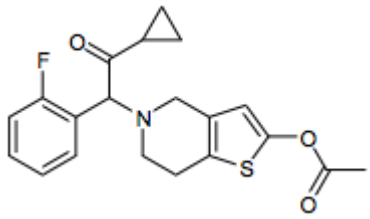
Obr. 4 – Vzorec tiklopidinu.

2.2.2.2. Klopidogrel (Obr. 5, Clopidogrel Actavis, Clopidogrel AL, Apotex, Mylan, Orion, Stada, Teva, Clopigamma, Trombex) je po absorpci z gastrointestinálního traktu metabolizován zejména v játrech cytochromem P450 na účinný metabolit (thiolový derivát). Metabolit se ireverzibilně váže na destičkové ADP ($P2Y_{12}$) receptory. V doporučované dávce (75 mg 1× denně) ovlivní funkci destiček ze 40 až 60 %. Účinek lze zjistit již po první dávce (2–4 h) a maximální účinek nastává po 3–4 dnech (Gladding et al, 2008).



Obr. 5 – Vzorec klopidogrelu.

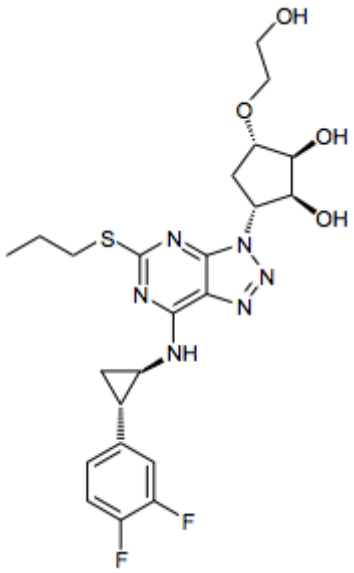
2.2.2.3. Prasugrel (Obr. 6, Efient) je thienopyridin 3. generace, od předchozích generací se významně liší. Je sice proléčivem s nutností konverze, aktivuje se ale už ve střevní stěně a jeho metabolizmus není ovlivněn cytochromem P450. Tím má méně lékových interakcí a je funkční i u pacientů rezistentních ke klopidogrelu. Další důležitou výhodou je významně rychlejší nástup účinku při srovnání s klopidogrelem či s tiklopidinem (t_{max} je pouze 30–60 min.) (Wiviott et al, 2007).



Obr. 6 – Vzorec prasugrelu.

2.2.2.4. Tikagrelor (Obr. 7, Brilique) se na rozdíl od předchozích thienopyridinů váže na ADP receptory reverzibilně. Nepotřebuje biotransformaci přes cytochrom P-450, tím je sníženo riziko lékových interakcí. V porovnání s klopidogrelem má rychlejší nástup účinku, výraznější inhibici trombocytů, jeho

podávání navíce vede ke statisticky významně nižší celkové i kardiovaskulární mortalitě a nezvyšuje velké ani malé krvácení (Wallentin et al, 2009).



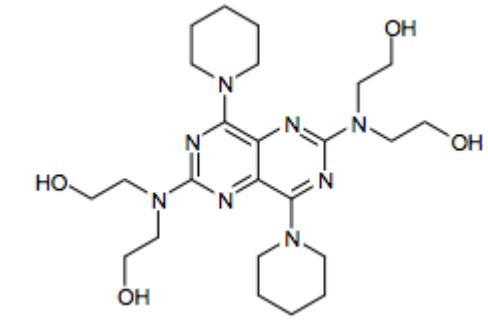
Obr. 7 – Vzorec tikagrelolu.

Kombinace kyseliny acetylsalicylové s antagonisty ADP receptorů je významně účinnější v prevenci trombotických komplikací než jednotlivé protidestičkové léky samotné, nepostradatelná je tato léčba u intervenčních zákroků a po akutních koronárních syndromech (Bhatt et al, 2006).

2.2.3. **Dipyridamol** (Obr. 8, Aggrenox)

Dipyridamol je pyrimido-pyrimidinový derivát s vazodilatačními a protidestičkovými vlastnostmi. Inhibuje vychytávání adenosinu v erytrocytech, krevních destičkách a endoteliálních buňkách. Následně dochází lokálně ke zvýšení koncentrace adenosinu, který působí na A_2 receptor trombocytů, čímž stimuluje destičkovou adenylátcyklázu, a tak zvyšuje hladinu cAMP v trombocytech. Dále blokuje fosfodiesterázu, tím dochází ke zvýšení koncentrace cAMP a cGMP. A také stimuluje tvorbu a uvolňování prostacyklinu z cévního endotelu, tím se snižuje přilnavost trombocytů (Souček, 2011; Suchopár et al, 2009).

V neurologii je fixní kombinace dipyridamolu s modifikovaným uvolňováním s ASA podle mezinárodních i českých doporučení řazena v důsledku vysoké účinnosti a bezpečnosti mezi léky první volby v prevenci recidiv ischemických cévních mozkových poruch (Krupička, 2006).



Obr. 8 – Vzorec dipyridamolu.

2.2.4. Antagonisté receptoru GP IIb/IIIa

Jde o antagonisty klíčového destičkového receptoru odpovědného za agregaci trombocytů - glykoproteinu IIb/IIIa. Jedná se o nejúčinnější antiagregancia - až 80-100% inhibice trombocytární agregace. Ačkoliv blokují agregaci destiček, neovlivňují jejich adhezivitu, ani koagulační faktory a po odeznění účinku nastává proagregační účinek, tím je nutná kombinace s inhibitory aktivace destiček. V klinické praxi jsou užívány pouze parenterální preparáty (Müller et al, 2002). Vývoj v oblasti nových perorálních antagonistů receptoru GP IIb/IIIa zatím stagnuje, důvodem je vyšší riziko krvácivých příhod a nedostatečná afinita k receptoru rezultující ve výše zmíněný rebound fenomén. Studie s perorálními blokátory byly před časem ukončeny a nejsou zprávy o nových nadějnějších molekulách. (Karetová a Bultas, 2009).

2.2.4.1. Abciximab (Reopro) - je rekombinantní chimérická protilátka tvořená myšími a humánními sekvencemi s ireverzibilní a velmi vysokou afinitou k receptoru GP IIb/IIIa. Po přerušení infuze se destičková funkce normalizuje během 24 až 48 hodin, protilátky vázané na destičky a ovlivňující jejich funkci přetrvávají ve vazbě až po 14 dní. Z vysoké afinity a dlouhého účinku plyne na jedné straně výhodný

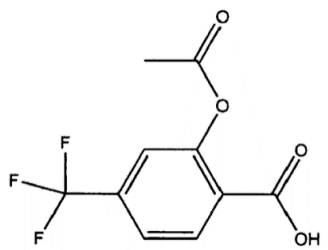
farmakokinetický profil, na straně druhé však i déletrvající riziko krvácení (Salam and Suwaidi, 2002).

2.2.4.2. Eptifibatid (Integrilin) - je cyklický heptapeptid. Vede k reverzibilní blokádě agregace destiček tím, že brání vazbě fibrinogenu i dalších adhezivních molekul na glykoproteinové receptory membrán trombocytů. Účinek nitrožilní infuze závisí na dávce – k 50% obnově funkce destiček dochází již čtyři hodiny po jeho vysazení

2.2.5 Blokátory tromboxanových receptorů a inhibitory tromboxan A_2 syntázy

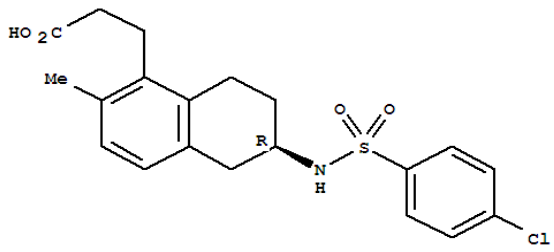
Tlumit primární hemostázu na úrovni tromboxanové cesty aktivace můžeme dvojím způsobem. Prvním je inhibice syntézy tromboxanu A_2, druhou je blokáda jeho receptorů na úrovni trombocytu či cévní stěny.

2.2.5.1. Triflusal (Obr 9) - derivát ASA, který rovněž preferenčně a ireverzibilně inhibuje COX-1. Inhibice COX-1 je sice slabší než po podání ASA, nicméně tento nedostatek bohatě kompenzuje skutečnost, že se jedná o blokádu semiselektivní. To znamená, že je potlačena syntéza trombocytární cyklooxygenázy, tedy syntéza TXA_2, ale v endoteliích je COX-1 tlumena o řád méně, a blokáda syntézy prostacyklinu je proto nevýznamná. Navíc triflusal stimuluje NO-syntázu a zvýšenou nabídkou oxidu dusnatého funkci endotelu zlepšuje. Jeho potenciálem by mohla být protidestičková léčba nemocných s intolerancí či rezistencí na ASA a zejména u astmatiků s „aspirinem“ indukovanou dušnosti. V ČR se ale toto léčivo nepoužívá.



Obr. 9 – Vzorec triflusalu.

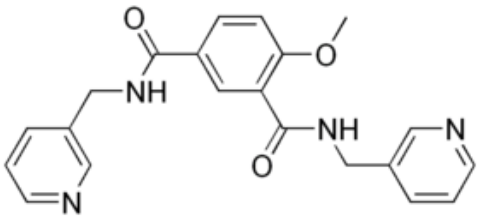
2.2.5.2. Terutroban (Obr. 10) - je selektivní antagonista tromboxanového receptoru. Na tyto receptory se kromě vazokostrikčně a proagregačně působícího TXA_2 mohou vázat i analogicky působící PGG_2 či PGH_2. Terutroban má v experimentu antitrombotické a vazodilatační vlastnosti. Klinický účinek byl prověřován proti standardní dávce ASA ve studii PERFORM u téměř 20 tisíc nemocných po ischemické mozkové příhodě. Studie byla předčasně po více než dvou letech ukončena pro shodný účinek na pokles výskytu mozkových příhod, infarktu myokardu či úmrtí z cévních příčin v obou větvích. Výskyt krvácení mírně stoupl v terutrobanové větvi. Zprávy o pokračování v klinickém hodnocení terutrobanu nejsou, vývoj je pravděpodobně zastaven (Bultas, Karetová, 2012).



Obr. 10 – Vzorec terutrobanu.

2.2.5.3. Pikotamid (Obr 11) - mechanismem účinku této látky je kombinace blokády syntézy tromboxanu (inhibicí tromboxan A2 syntázy) a blokády tromboxanových receptorů. Probíhaly dvě velké randomizované studie na posouzení klinické účinnost pikotamidu u pacientů s rizikem aterotrombózy. U studie ADEP se jednalo o pacienty s onemocněním periferních tepen, pacienti byli randomizováni do skupin pikotamid nebo placebo. Tato studie neprokázala významné snížení kardiovaskulárních příhod ve skupině s pikotamidem ale analýza podskupin ukázala jeho potenciální užitečnost u pacientů s diabetem. Studie DAVID zkoumá vliv na diabetické pacienty opět s onemocněním periferních tepen. Randomizace opět zahrnovala dvě skupiny, tentokrát pikotamid a ASA. Výsledky ukázaly významné snížení celkové úmrtnosti ve skupině s pikotamidem. Kromě toho dlouhodobá léčba diabetu pikotamidem podporuje snížení mikroalbuminurie a inhibici růstu karotických

plaků. Tyto údaje naznačují, že pikotamid může představovat zajímavý lék (Celestini and Violi, 2007).



Obr. 11 – Vzorec pikotamidu.

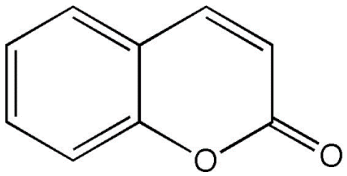
Intenzivně probíhá výzkum nových látek spojující vlastnosti protidestičkové a antikoagulační.

2.2.6. Kumariny

Kumariny (základní struktura na Obr. 12) jsou velkou skupinu přírodních látek, které jsou široce zastoupeny ve významných množstvích v rostlinách, ale jejich přítomnost byla také zjištěna v mikroorganismech a živočišných zdrojích, využívají se jako koření a v tradiční medicíně. Jedná se o deriváty 1,2 benzopyronů. Kumariny jsou strukturálně velmi pestrou skupinou. Rozdělují se do různých kategorií, od jednoduchých kumarinů po různé druhy polycyklických kumarinů, jako jsou například furanokumariny a pyranokumariny (Borges et al, 2005). Existují ve volné formě nebo ve formě glykosidicky vázaných sloučenin. Kumariny jsou skupinou sloučenin, které vykazují řadu překvapujících biologických účinků (Pedersen et al, 2007). Mezi složitější příbuzné sloučeniny na bázi kumarinového jádra patří nejznámější kumarin - warfarin, který se užívá jako antikoagulační léčivo. Jednoduché kumariny a jejich analogy jsou nyní rozsáhlou skupinou, která přitahuje zájem. Tato skupina má velmi zajímavé vlastnosti: protinádorové, antimikrobiální, působí tlumivě na CNS (Hoult a Payá,1996). Zejména pak jejich antioxidační, antiagregační, snižující cholesterol, protizánětlivé a vasorelaxační vlastnosti mohou předurčovat některé kumariny k léčbě či prevenci kardiovaskulárních onemocnění (Fylaktakidou et al, 2004). Všechny účinky kumarinů na lidský organismus nejsou zatím zcela známy a to i přes rozsáhlý *in vitro* a *in vivo*

výzkum prováděný v současné době. Některé přírodní nebo syntetické deriváty už našly farmaceutické uplatnění, typickým příkladem je zmíněný warfarin.

Z toxikologického hlediska jsou významné zejména furanokumariny, které způsobují v kombinaci s UV zářením kožní fototoxicitu a genotoxicitu. Toxický účinek se projeví na světle jako zarudnutí kůže, pálení, svědění, zánět, otok nebo výrazná alergická reakce. Počáteční příznaky mohou vést až k nekrotizaci velkých ploch pokožky (Raquet and Schrenk, 2014). Na molekulární úrovni je zjištěno, že furanokumariny mohou způsobit cykloadice v polohách 3, 4 nebo 4´, 5´ nebo oboje s pyrimidinovými bázemi DNA, mohou se tedy zabudovat do nukleových kyselin a poškodit genom. Takto lze vysvětlit jejich mutagenní a karcinogenní vlastnosti (tvorba melanomů). Z celkových příznaků furanokunarinů se může objevit žloutenka (Řeháčková, 2009).



Obr. 12 – Vzorec základního (nesubstituovaného) kumarinu

2.2.6.1. 4-methylkumariny - tyto látky jsou široce zkoumanými deriváty kumarinů, které jsou syntetizovány z 3,4–kumarinu. Syntéza probíhá právě přes 3,4-kumariny, které se klinicky nejeví jako výhodné, neboť mohou tvoři epoxidy. Kumarinové epoxidy jsou považovány za mutagenní a pravděpodobně mají i další toxické účinky (Hanumantarao, 1998). Některé 4-methylkumariny ukázaly slibné antioxidační účinky, jako je inhibice peroxidace lipidů a vychytávání peroxidových anionů. 4-methylkumariny chelatují se železem, čímž snižují produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), což hraje důležitou roli v patogenezi onemocnění srdce a cév (Mladěnka et al, 2010).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. CÍL PRÁCE

V předchozích studiích ve skupině Kardiovaskulární farmakologie a toxikologie byl dokumentován účinek některých kumarinů na agregaci destiček navozenou arachidonovou kyselinou. 5,7-dihydroxykumariny byly obecně podobně účinné jako kyselina acetylsalicylová.

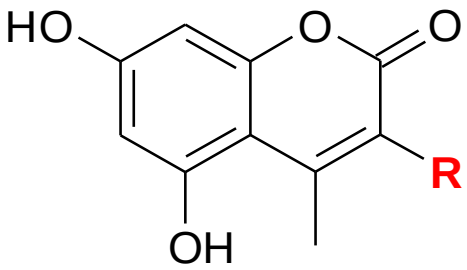
Cílem této práce bylo zjistit mechanismus účinku těchto látek na agregační kaskádu navozenou uvolněním arachidonové kyseliny a porovnat účinky těchto látek s kyselinou acetylsalicylovou.

3.2. METODIKA

3.1.1. Materiál

Kyselina arachidonová (AA), adenosin difosfát (ADP) a kolagen byly zakoupeny od Chrono-Log Co (Havertown, Pennsylvania, USA), citrát sodný z firmy Biotika (Slovenska Ľupča, Slovensko). Tromboxan B_2 EIA kit, prostaglandin H_2, U–46619 a COX inhibitor screening test kit byly zakoupeny od Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA). Dimethyl sulfoxid (DMSO), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), indomethacin, kyselina acetylsalicylová (ASA), dipyridamol byly zakoupeny od Sigma Aldrich (Německo). Testované látky - 5,7 - dihydroxy - 4 – methylkumariny (Obr. 13) byly syntetizovány na katedře chemie na univerzitě v Dillí, Indie.

3.1.2. Testované látky



Obr. 13 - Vzorce 4-methylkumarinů použitých ve studii.

A: R=H (5,7-dihydroxy-4-methylkumarin)

B: R=$CH_2COOC_2H_5$ (3-ethoxykarbonylmethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin)

C: R=$CH_2CH_2COOC_2H_5$ (3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin)

3.1.3. Dárci a zpracování krve

Krevní vzorky byly shromážděné od zdravých nekuřáků - dobrovolníků do plastových jednorázových zkumavek obsahujících 3,8% citrátu sodného (1:9, V / V). Do odebrané krve byl okamžitě přidán inhibitor COX, indometacin, aby jeho finální koncentrace v krvi byla 10 μM. Všichni dobrovolníci byly zdravotničtí pracovníci, kteří dali informovaný souhlas ke studii a kteří se neléčí dlouhodobě žádnými léčivy. Před odběrem byli všichni dárci alespoň 12 hodin na lačno. Studie byla provedena pod dohledem Etické komise Univerzity Karlovy v Praze, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a v souladu s Helsinskou deklarací.

Odebraná krev se nechala centrifugovat při 500 g po dobu 10 minut (odstředivka Boeco U-32R, rotor Hettich 1611, Německo). Tímto se získala plazma bohatá na destičky (PRP). Odstředěním zbývající krve (2500 g) po dobu 10 minut se získala plazma chudá na destičky (tzv. platelet poor plasma, PPP). Počet krevních destiček byl zjištěn za použití průtokového cytometru BDAccuri C6, který je vybaven BD CFlow softwarem (BDAccuri cytometry Inc, USA). PRP byla naředěna zmíněnou PPP na finální koncentraci $250*10^9$ destiček /l, se kterou byly provedeny všechny experimenty.

3.1.4. Stanovení interakce s tromboxanovými receptory

Agregace destiček navozená agonistou tromboxanových receptorů U-46619 (Cayman Chemical Company, U.S.A.) byla stanovena podle turbidimetrie (Ilustrativní obr. 9) a to prostřednictvím Chrono-log-500 Ca agregometru (Chrono-Log Co, USA) se softwarem Aggro / Linksoftware, Chrono-Log Co, USA. Kontrolou byla PPP jako kontrola. Stručně: 500 μl PRP se napipetovalo do kyvety a míchalo se při 1000 otáčkách za minutu s magnetickým míchadlem při teplotě 37 °C po dobu 2 minut v agregometru. Testované kumariny, stejně jako standardní léky, byly rozpuštěny v DMSO. 5 μL různých koncentracích testovaných kumarinů nebo DMSO se pak přidalo do reakční kyvety a inkubovalo při 37 °C po dobu 3 minut. Po uplynutí inkubační doby, byla agregace destiček vyvolaná přidáním U-46619 (Obr. 14). Proces agregace byl sledován po dobu 5 min.

3.1.5. Zjištění inhibice tromboxan A_2 syntázy

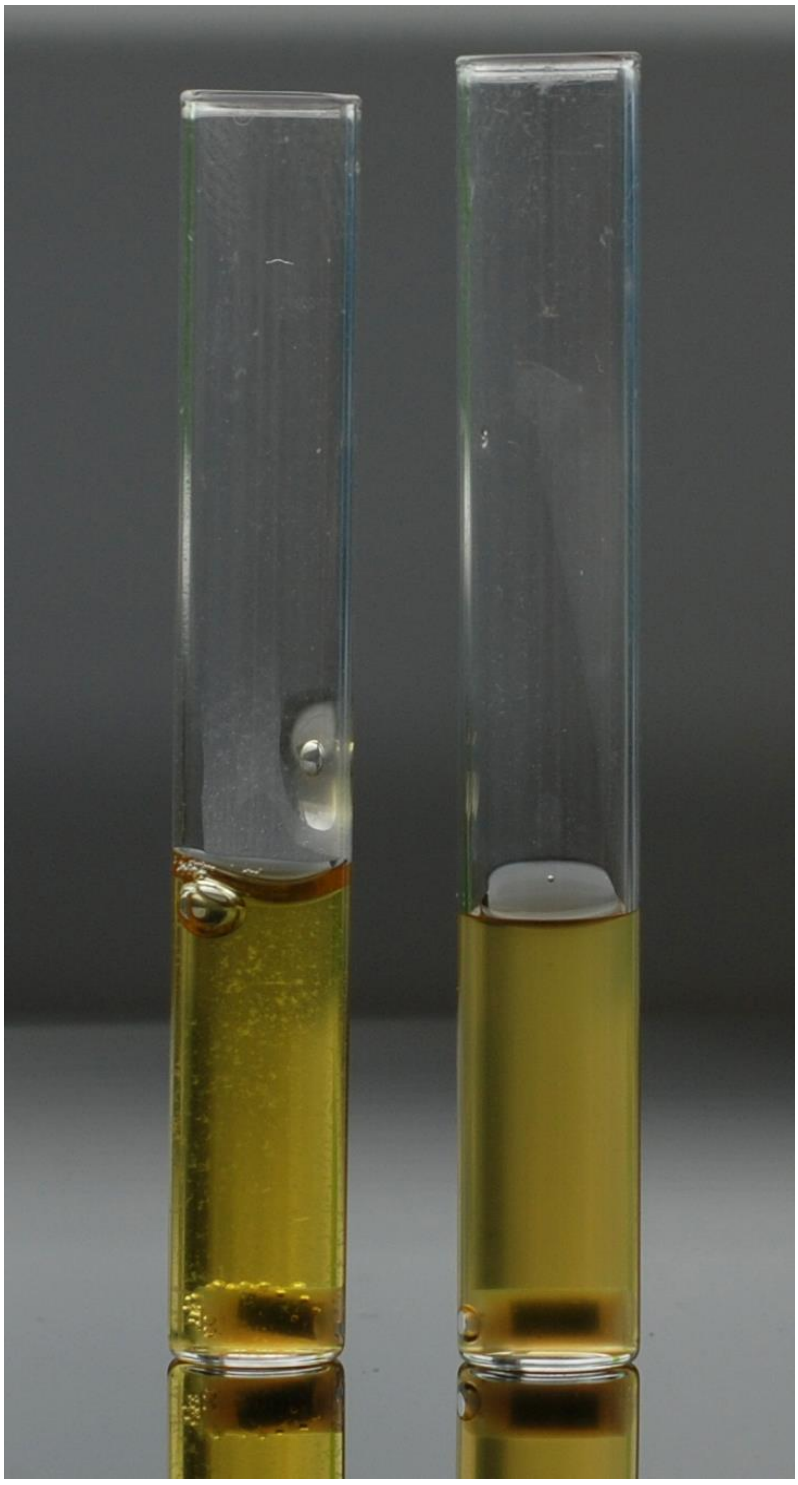
Inhibice tromboxansyntázy byla hodnocena podle metody Chang et al. (1997), s menšími modifikacemi. PRP obsahující indomethacin byla inkubována s testovanými sloučeninami po dobu 3 minut při teplotě 37 °C. Po přidání prostaglandinu H_2 (50 ng), směs byla inkubována po dobu 5 minut. Inkubace byla okamžitě ukončena přidáním vychlazeného EDTA (2 mM) a vzorek centrifugován při 10500 g po dobu 2 min. Hladiny tromboxanu B_2 v supernatantu byly změřeny za použití tromboxanu B_2 EIA kit (Cayman Chemical Company) podle instrukcí výrobce.

3.1.6. Zjištění inhibice cyklooxygenázy 1

K vyhodnocení COX-1 inhibice byl použit komerční set COX inhibition screening assay kit No.560131 (Cayman Chemical Company), který nedává falešně pozitivní výsledky s antioxidanty. ASA nebo kumariny rozpuštěné v DMSO (konečná koncentrace DMSO 2% V/V), byly inkubovány s ovčí COX-1 při 37 °C a AA (konečná koncentrace 100 μM) byla přidána do směsi, aby se zahájila reakce. Tvořený prostaglandin H_2 byl měřen po jeho selektivní redukci na prostaglandin F_2 chloridem cínatým a změřen metodou ELISA. Procento inhibice bylo v souvislosti s pozitivní kontrolou s DMSO.

3.1.7. Statistická analýza

Všechny údaje jsou uvedeny jako průměr ± SD. Agregační křivky pro inhibici tromboxanových receptorů a COX-1 byly porovnány s použitím 95% intervalů spolehlivosti. Všechna statistická vyhodnocení se prováděla pomocí GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).



Obr. 14 – Ilustrační obrázek agregace PRP.

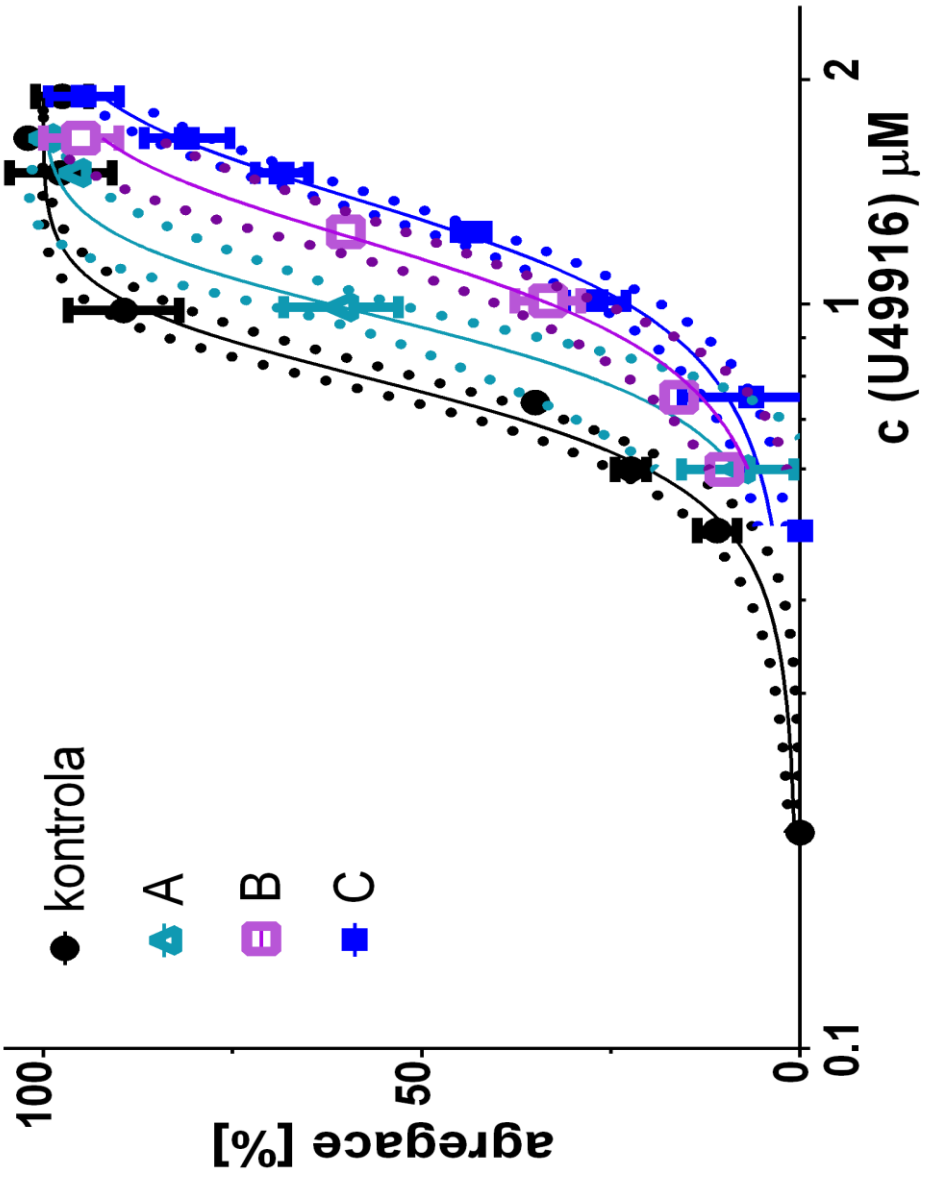
V levé kyvetě se nachází vzorek, kde proběhla agregace. V pravé kyvetě agregace neproběhla.

4. VÝSLEDKY

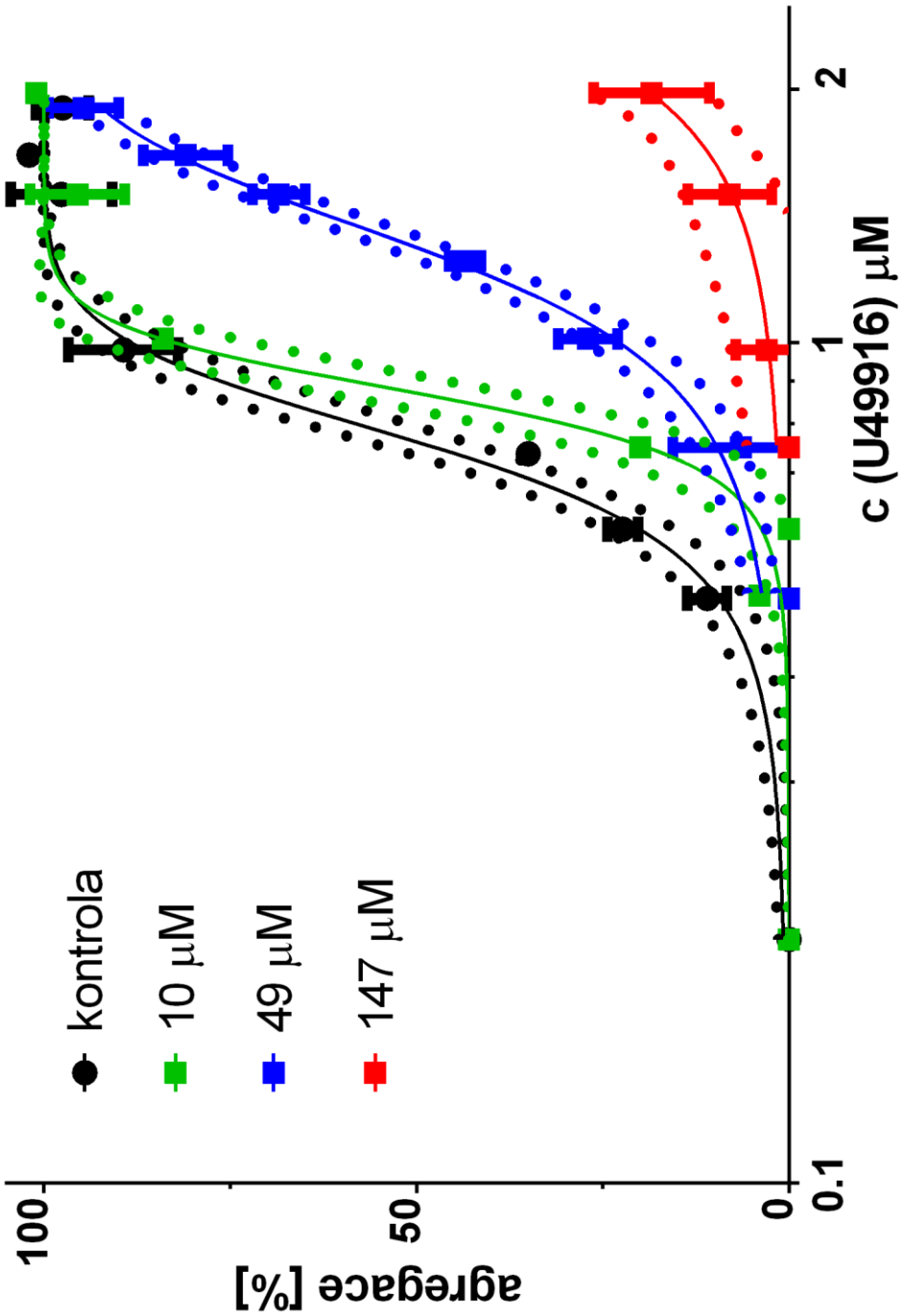
Všechny testované látky byly schopny snížit agregaci navozenou podáním tromboxanového analoga (Obr. 15). Nejúčinnější byly 3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin a 3-ethoxykarbonylmethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin. Z porovnání konfidenčních intervalů je vidět, že mezi nimi není prakticky rozdíl. Třetí testovaná látka 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin byla sice méně účinná než předchozí testované ale oproti kontrole vykazovala jednoznačný antiagregační účinek.

Účinek těchto látek byl dávkově závislý, jak je patrné z výsledků s 3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin (Obr. 16). Nejvyšší dávka prakticky zcela eliminovala navozenou agregaci. Z daných výsledků je tedy patrné, že látky působí jako kompetetivní antagonisté, protože vyšší koncentrace agonisty tromboxanových receptorů snížila jejich protiagregační účinek.

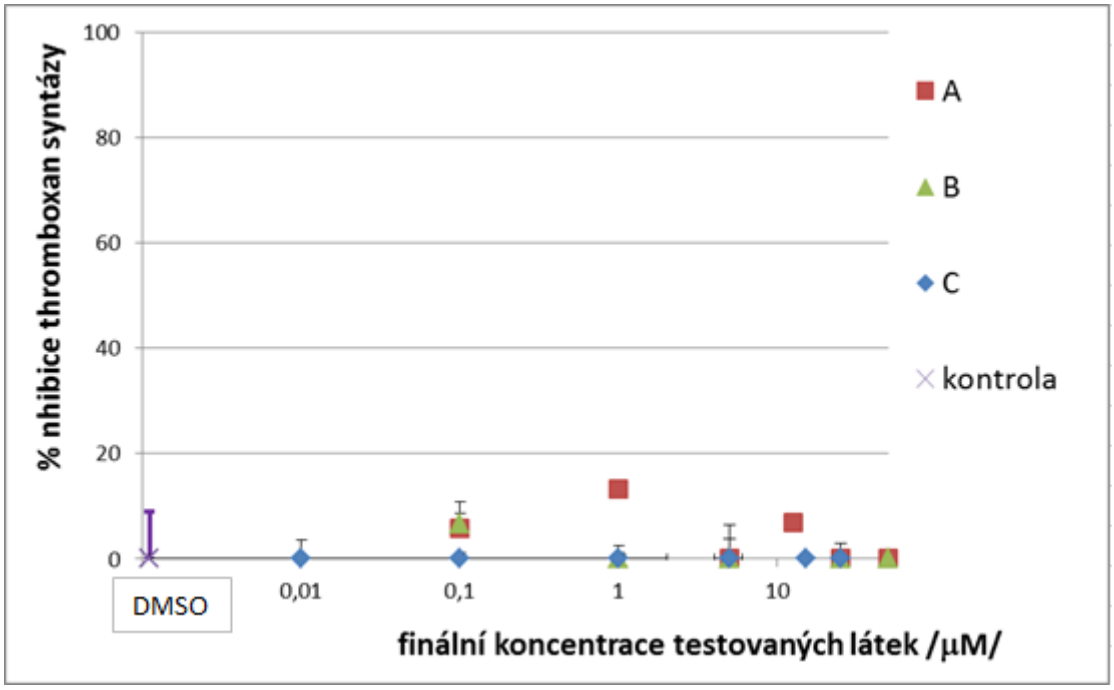
Testované látky neměly významný účinek na metabolickou aktivitu tromboxansyntázy (Obr. 17), ale ovlivnily funkci cyklooxygenázy. Jejich účinek na tuto ovčí isoformu cyklooxygenázy 1 v *in vitro* podmínkách byl zřetelně vyšší v porovnání s kyselinou acetylsalicylovou (Obr. 18). Schopnost blokovat cyklooxygenázu 1 byla nejvíce vyjádřena u 3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarinu, poté účinnost klesala v pořadí 3-ethoxykarbonylmethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin a nejméně účinným blokátorem byl 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin.



Obr. 15 - Ovlivnění agregace navozené tromboxanovým analogem U49916. Jako kontrola bylo použito jen rozpouštědlo DMSO. Testované látky byly testovány ve finální koncentraci 49 µM. Osa x má logaritmické měřítko. A: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin, B: 3-ethoxykarbonylmethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin. C: 3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin.

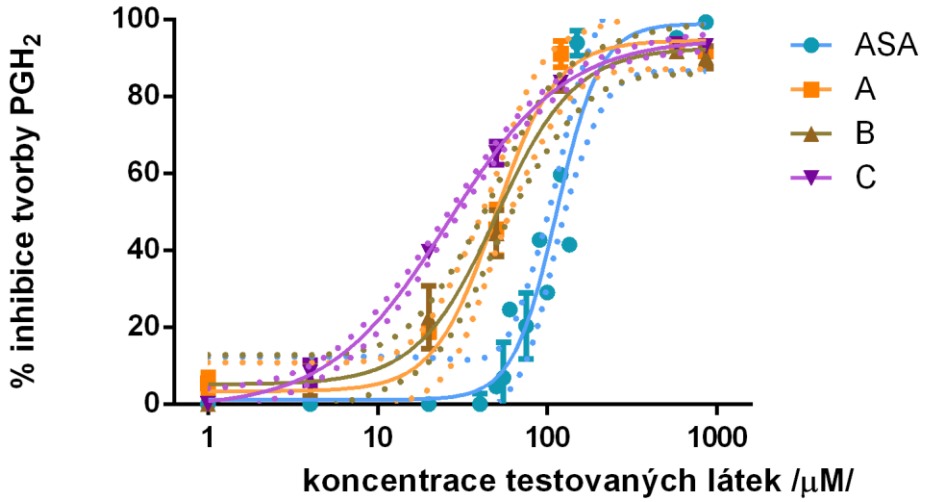


Obr. 16 – Porovnání různých koncentrací 3-ethoxykarbonyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarinu. Osa x je zobrazena v logaritmickém měřítku.



Obr. 17 - Inhibice tromboxansyntázy v lidských destičkách.

Pro porovnání je zobrazena kontrola DMSO. Je vidět, že žádná z testovaných látek nebyla schopna výrazně ovlivnit tromboxansyntázu. A: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin, B: 3-ethoxykarbonylmethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin. C: 3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin.



Obr. 18 - Inhibice cyklooxygenázy 1 testovanými látkami. Pro porovnání je zobrazena acetylsalicylová kyselina (ASA). A: 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin, B: 3-ethoxykarbonylmethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin. C: 3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin.

5. DISKUZE

Protidestičková léčba představuje základní léčebný postup v prevenci i léčbě některých kardiovaskulárních onemocnění, které patří stále k nejčastějším příčinám mortality i morbidity. Bohužel dostupné postupy mají stále řadu nevýhod. Často diskutovaným problémem nejčastěji užívaného protidestičkového léku, ASA, je rezistence. Účinnou alternativou u nemocných, kde nelze podat ASA je klopidogrel, ale riziko neúčinnosti je i u tohoto léku. Bohužel rezistence k léčbě může být na oba léky současně. Proto prostá záměna jednoho léčiva za druhé jmenované nemusí problém vyřešit. U klopidogrelu je navíc určitou nevýhodou několikahodinové prodlení do nástupu účinku (Matetzky et al, 2004). Hlavním důvodem, proč část nemocných nereaguje správně na klopidogrel je nejspíš nedostatečná konverze klopidogrelu na vlastní aktivní metabolit, jelikož se podává pro lepší vstřebávání jako proléčivo. Tikagrelor má stejný mechanismus účinku jako thienopyridiny. Na rozdíl od nich je inhibice reverzibilní a není potřeba konverze na aktivní metabolit. Díky tomu, že u tikagreloru není potřeba metabolizace na aktivní metabolit, je protidestičkový efekt ve srovnání s klopidogrelem spolehlivější. Rezistence by se mohla překonat kombinacemi nových léčiv. Kombinace léčebných postupů s různými mechanizmy účinku totiž potencuje výsledný terapeutický efekt. V současné době se užívá kombinace thienopyridinů a ASA a dále také dipyridamolu s ASA. Výhodná kombinace by mohlo být podávání ASA s léky, které mají antioxidační účinek. Antioxidační látky totiž pomáhají snížit riziko rozvoje aterosklerózy a jejich následků, mezi nimiž je trombóza nejnebezpečnější.

Inhibitory receptorů IIb/IIIa, mají nevýhodu nutnosti parenterálního podaní, vysokého krvácivého potenciálu, nedostatečnou afinitu k receptoru a vyššího rizika protrombotického stavu (Kini et al, 2002).

Novinek ve skupině inhibitorů syntézy tromboxanu A_2 (TXA_2) či blokátorů jeho receptorů není mnoho. Alternativou ASA je triflusal. Na rozdíl od ASA preferenčně inhibuje cyklooxygenazu 1 (COX-1). Jeho potenciálem by mohla být protidestičková léčba nemocných s intolerancí či rezistencí na ASA a zejména u astmatiků

s „aspirinem“ indukovanou dušnosti. Úspěšnému zavedení triflusalu braní vysoká cena (Karetová a Bultas, 2009).
Existuje tedy mnoho důvodů pro zavádění nových protidestičkových léků.

Právě výsledky zkoumání 5,7 -dihydroxy - 4 – methylkumarinů prokazují antiagregační vlastnosti srovnatelné s ASA. Jejich mechanismus účinku není ještě zcela znám, ale víme, že ovlivňují funkci cyklooxygenázy 1 a také se zdá, že by 5,7 - dihydroxy - 4 – methylkumariny mohly být kompetitivními antagonisty na receptorech tromboxanu A_2. Je ale možné, že mohou působit i na dalších úrovních agregace navozených aktivací zmíněných tromboxanových receptorů. Toto nebylo možné v této studii detailněji prozkoumat.

Toto zjištění může být ve farmakologickém zájmu, protože antiagregační aktivita na dvou po sobě jdoucích krocích agregace destiček může být velkým přínosem zejména u pacientů rezistentních na konvenční protidestičkovou léčbu. Navíc jsou již známy látky působící na dvou úrovních, například pikotamid. Mechanismem účinku pikotamidu je kombinaci blokády syntézy tromboxanu (inhibicí tromboxan A_2 syntázy) a blokády tromboxanových receptorů. Ale výsledky klinických studií s touto látkou nejsou zatím příliš průkazné, je možné, že je jeho účinek nějakým zatím neznámým mechanismem snížen při podání u lidí. Proto je určitě výzkum v této oblasti velmi zajímavý, navíc látky, které jsou antagonisty jak tromboxanových receptorů tak inhibitory COX-1 zatím nebyly popsány.

Antiagregační vlastnosti u některých typů kumarinů již byly popsány, ale zatím u žádných nebyl zjištěný mechanismus účinku podobný 5,7-dihydroxy-4–methylkumarinům. Mechanismy antiagregační aktivity kumarinů se zdají být různorodé. Dostupné studie ukázaly, že různé substituce na základním kumarinovém jádře jsou spojeny s velmi odlišným antiagregačním mechanismem. Například silný antiagregační kumarin 8-methyl-4-(1-piperazinyl)-7-(3-pyridylmethoxy)kumarin by mohl být potenciálním inhibitorem lidské agregace destiček in vitro vůči všem použitým induktorům agregace destiček. Mechanismus účinku 8-methyl-4-(1-piperazinyl)-7-(3-pyridylmethoxy)kumarin je zprostředkován zvýšením intracelulární úrovně cAMP přes specifickou inhibici cAMP fosfodiesterázy. U tohoto kumarinu je dokázáno, že snižuje hladinu intracelulárního kalcia a aktivaci proteinkinázy C

vyvolané trombinem. Také zvyšuje produkci oxidu dusnatého přímo stimulací destičkové enzymové syntázy oxidu dusnatého (Braccio et al, 2004).

I z tohoto ohledu je patrné, že tyto testované 4-methylkumariny mají unikátní mechanismus účinku. Před dalším zkoušením bude ale nutné kromě potvrzení účinnosti na *in vivo* modelu vyzkoušet také jejich farmakokinetické vlastnosti, které mohou být překážkou jejich uplatnění.

6. ZÁVĚR

V této rigorózní práci byly sledovány protidestičkové účinky 5,7-dihydroxy-4-metylkumarinů. Testované látky neměly významný účinek na metabolickou aktivitu tromboxansyntázy, ale bylo prokázáno, že 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny mohou blokovat COX-1 a současně působit jako antagonisté na tromboxanových receptorech. Nejúčinnějším ze zkoumaných kumarinů byl 3-ethoxykarbonylethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin, poté účinnost klesala v pořadí 3-ethoxykarbonylmethyl-5,7-dihydroxy-4-methylkumarin a nejméně účinným byl 5,7-dihydroxy-4-methylkumarin.

Vzhledem k tomu, že se 5,7-dihydroxy-4-methylkumariny zdají být zajímavými dvoustupňovými inhibitory agregace krevních destiček, je další výzkum v této oblasti velmi žádoucí.

7. LITERATURA

Belej K., Léky ovlivňují koagulaci v urologii, Urolog Pro Praxi, 2008; 9(2): 64-68

Bhatt D. L., Fox K. A., Hacke W. et al, Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events, N Engl J Med, 2006; 354: 1706–1717.

Bode W., Structure and interaction modes of thrombin, Blood Cells Mol Dis, 2007; 36(2): 122–30

Borges F., Roleira F., Milhazes N. et al, Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological aktivity, Curr Med Chem, 2005; 12: 887-916

Braccio M., Grossi G., Roma G., et al, Synthesis and in vitro inhibitory activity on human platelet aggregation of novel properly substituted 4-(1-piperazinyl)coumarins, Eur J Med Chem, 2004, 39(5): 397-409

Bultas J., Karetová D., Protidestičková léčba – kde jsme a co můžeme očekávat?, Remedia, 2012;22 104 – 115

Celestini A. and Violi F., A review of picotamide in the reduction of cardiovascular events in diabetic patients, Vasc Health Risk Manag, 2007; 3(1): 93–98.

Collen D. and. Lijnen H. R, Blood, 1991; 78(12):3114-3124

Colman R. W., Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006; str. 3-5

Davie, E. W., Kulman, J. D. An overview of the structure and function of thrombin Semin Thromb Haemost, 2006; 32(1): 3-15.

Dougald M. Monroe, Maureane Hoffman and Harold R. Roberts, Platelets and Thrombin Generation, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002; 22: 1381-1389

Gawaz M., Langer H., May A. E., Platelets in infl ammation andatherogenesis J Clin Invest, 2005; 115(12): 3378–3384.

Esmon Ch. T., Role of Coagulation Inhibitors in Inflammation, J Thromb Haemost, 2001; 86(1): 51-56

Fylaktakidou K. C., Hadjipavlou-Litina D. J., Litinas K. E. et al, Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities, Curr Pharm Res, 2004; 10: 3813 - 3833.

Gladding P., Webster M., Zeng I., et al., The pharmacogenetics and pharmacodynamics of klopidogrel response: an analysis from the PRINC (Plavix Response in Coronary Intervention) trial. JACC Cardiovasc Interv, 2008; 1(6): 620–627.

Gumulec J., Krvácivé komplikace předávkování antikoagulační léčby, KlinFarmakol Farm, 2012; 26(2): 84-89

Hanumantharao G. R., Rakesh K. S., Bhagwan S. G. et al, Mechanism of Biochemical Action of Substituted 4-Methylbenzopyran-2-ones. Part 3: A Novel Mechanism for the Inhibition of Biological Membrane Lipid Peroxidation by Dioxygenated 4-Methylcoumarins Mediated by the Formation of a Stable ADP-Fe-Inhibitor Mixed Ligand Complex, Bioorg Med Chem, 1998;6: 2205-2212

Hoffman M, Dougald M. Monroe, A Cell-based Model of Hemostasis, J Thromb Haemost, 2001; 85(6): 958-965

Hirata T., Ushikubi F., Kakizuka A. et al, Two Thromboxane A2 Receptor Isoforms in Human Platelets, J Clin Invest, 1996; 97(4): 949-955

Hoult J. R., Payá M., Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential, Gen Pharmacol, 1996; 27(4): 713-22.

Chang T. S., Kim H. M., Lee K. S. et al., Thromboxane A2 synthase inhibition and thromboxane A2 receptor blockade by 2-[(4-cyanophenyl)amino]-3-chloro-1,4-naphthalenedione (NQ-Y15) in rat platelets, Biochem Pharmacol, 1997;54: 259-268.

Jackson S. P. The growing complexity of platelet aggregation. Blood, 2007; 109(12): 5087–5095.

Karetová D., Bultas J., Nové protidestičkové léky v léčbě kardiovaskulárních chorob, Interni Med, 2009; 11(4): 175–177

Kini A. S., Richard M., Suleman .J, et al. Effectiveness of tirofiban, eptifibatide, and abciximab in minimizing myocardial necrosis during percutaneous coronary intervention (TEAM pilot study), Am J Cardiol, 2002;90:526–9.

Krupička J., Kombinace kyseliny acetylsalicylové s dipyridamolem: ano, či ne?, Remedia, 2006; 16(1): 124-125

Langmeier M., Kittnar O., Marešová D. et al, Základy lékařské fyziologie, Grada Publishing a.s., Praha, 2009, str. 49

Macáková K., Řeháková Z., Mladěnka P. et al, In vitro platelet antiaggregatory properties of 4-methylcoumarins, Biochimie, 2012; 94: 2681-2686

Mackman N., Tilley R. E., Key N. S., Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis, J Am Heart Ass, 2007; 27: 1687-1693

Marek J., Bartůňková J., Broulík Petr et al, Farmakoterapie vnitřních nemocí - 4. zcela přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing a.s., Praha, 2010, str. 41

Martínková J, Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů, Grada Publishing a.s., Praha, 2007, str. 255

Malý M. Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi, 2004, Grada Publishing a.s., Praha, str: 59

Matetzky S., Shenkman B., Guetta V. et al, Clopidogrel resistence is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction, Circulation, 2004; 109: 3171–3175

Mizuno N., Suzuki T., Kishimoto Y., Hirasawa N., Biochemical Assay of G Protein-Coupled Receptor Oligomerization: Adenosine A1 and Thromboxane A2 Receptors Form the Novel Functional Hetero-oligomer, Methods Cell Biol, 2013; 117: 213-27

Mladěnka P., Macáková K., Zatloukalová L. et al, In vitro interactions of coumarins with iron, Biochimie, 2010, 92(9): 1108-1114

Monroe M., Hoffman M. and Roberts H. R., Platelets and Thrombin Generation, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002; 22:1381-1389

Mourek J, Fyziologie - Učebnice pro studenty zdravotnických oborů – 2., doplněné vydání, Grada Publishing a.s., Praha, 2012, str: 25

Michiels C., Endothelial cell functions, J Cell Physiol, 2003;196(3):430-443

Müller I., Massberg S., Zierhut W. et al. Effects of aspirin and clopidogrel versus oral anticoagulation on platelet function and on coagulation in patients with nonvalvular atrial fibrillation (CLAFIB), Pathophysiol Haemost Thromb, 2002;32(1):16–24

Navrátil L., Filip S. a Víšek V., Vnitřní lékařství - Pro nelékařské zdravotnické obory, Grada Publishing a.s., Praha, 2008, str. 225

O´Donnell M. J., Hankey G. J., Eikelboom J. W., Antiplatelet therapy for secondary prevention ischemic stroke: A critical review. Stroke, 2008; 39 (5): 1638–1646

Patrono C., Bachmann F., Baigent C. at al; European Society of Cardiology. Expert Consensus Document on the Use of Antiplatelet Agents, Eur Heart J, 2004; 25(2): 166-81.

Pedersen J. Z., Oliveira C., Incerpi S. et al, Antioxidant activity of 4-methylcoumarins, J Pharm Pharmacol, 2007; 59(12): 1721–1728

Price M. J., Bedside Evaluation of Thienopyridine Antiplatelet Therapy, Circulation, 2009; 119: 2625-2632

Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Flower R. J., Haemostasis and thrombosis. In: Rang and Dale's Pharmacology, Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia, 2007: 341

Raquet N. and Schrenk D., Application of the equivalency factor concept to the phototoxicity and -genotoxicity of furocoumarin mixtures, Food Chem Toxicol, 2014; 68C:257-266

Reilly, M., Fitzgerald G. A., Cellular activation by thromboxane A2 and other Eicosanoids, Eur Heart J, 1999; 14(K): 88-93.

Řeháčková Z., Vyhledávání biologicky aktivních rostlinných sekundárních metabolitů: testy antioxidační a antiagregační aktivity, Disertační práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2009

Salam A. M. and Suwaidi J. A., Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists in clinical trials for the treatment of coronary artery disease, Expert Opin Investig Drugs, 2002;11:1645–58.

Schenone M., Furie B. C., Furie B. The blood coagulation cascade. Curr Opin Hematom, 2004; 11(4): 272 - 277 .

Slezáková L., Mazalová L., Ostřanská A. et al., Ošetřovatelství v pediatrii, Grada Publishing a.s., Praha, 2010, str 126

Stejskal D, Prošková J, Petrželová A. et al, Application of cationic propyl gallate as inducer of thormbocyte aggregation for evalution of effectiveness of antiaggregation therapy, Biomed Pap, 2001;145(2): 69–74

Suchopár J., Valentová Š., Anders M. at al, Remedia compendum 4. Vydání, Panax Co, 2009; str. 128

Šlechtová J., Hemostáza – jak ji možná neznáme, Klin Biochem Metab, 2007; 15 (2): 97–101.

Špác J., Současná antiagregační terapie v praxi, Interní medicína pro praxi, 2008; 10(2): 69-73

Verhamme P, Hoylaerts M. F., The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. Acta Clin Belgica, 2006; 61(5): 213-9

Trojan S et al., Lékařská fysiologie, Grada Publishing, Praha, 1993, str. 141

Souček M, Vnitřní lékařství 1. Díl, Grada Publishing a. s., Praha, 2011, str: 193

Wiviott S. D., Braunwald E., McCabe C. H., Prasugrel versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes, N Engl J Med, 2007; 357(20): 2001-15

Wallentin L., Becker R. C., Budaj A., Ticagrelor versus Clopidogrel in Patients with Acute Coronary Syndromes, N EnglJ Med, 2009; 361(11): 1045-57

Wu K. K., Thiagarajan P., Role of endothelium in thrombosis and hemostasis, Ann Rev Med, 1996; 47: 315-331