

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Applová Lenka
Školitel: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.
Název disertační práce: Ovlivnění aktivace krevních destiček polyfenolickými látkami a jejich metabolity

Srážení krve je velice složitý a komplexní proces, ve kterém zauímají krevní destičky nepostradatelnou úlohu. Na druhé straně je jejich aktivace při některých patologických procesech nadměrná, a tudíž nežádoucí. Kardiovaskulární onemocnění jsou ve vyspělých zemích nejčastější příčinou mortality, a je bohužel známo, že i přes významné pokroky v léčbě, zůstává Česká republika v úmrtnosti na tato onemocnění za většinou zemí západní Evropy. Epidemiologické studie naznačují, že vyšší příjem (iso)flavonoidů je spojen se snížením mortality na kardiovaskulární onemocnění. Je také vhodné zmínit, že Česká republika patří ve statistikách k zemím s nejnižším obsahem flavonoidů v potravě z celé Evropy.

Cílem této disertační práce bylo zjistit, zda mohou polyfenolické látky, zejména (iso)flavonoidy a/nebo jejich metabolity, ovlivnit agregaci krevních destiček, a tedy nepřímo podpořit epidemiologické nálezy, tj. zda může existovat souvislost mezi těmito látkami a možným příznivým kardiovaskulárním působením na experimentální úrovni.

Celkově bylo v této práci otestováno 16 isoflavonoidů, 4 metabolity isoflavonoidů, 29 flavonoidních metabolitů a 12 syntetických xanthen-3-onů. Nejprve byl proveden screening jejich účinku na agregaci navozenou kyselinou arachidonovou (AA) a kolagenem s využitím impedanční agregometrie v plné lidské krvi. U velmi účinných látek byl otestován i mechanismus účinku: stanovení inhibice cyklooxygenázy-1 a tromboxan syntázy, antagonismu na tromboxanových receptorech, interference s vápníkovou signální kaskádou či inhibice vyplavení serotoninu. Tyto experimenty byly principiálně provedeny za pomoci ELISA stanovení finálních produktů nebo opět impedanční agregometrií.

Nejdříve byla otestována antiagregační aktivita isoflavonoidů, které byly v předchozích studiích nejúčinnějšími flavonoidy. Byl potvrzen dobrý inhibiční potenciál genisteinu a daidzeinu, ale tentokrát

i v plné lidské krvi, tedy v klinicky relevantnějším biologickém prostředí. Následně byl u nich nalezen inhibiční účinek proti destičkové cyklooxygenáze-1 a antagonistický vliv na tromboxanové receptory. Antagonismus na těchto receptorech byl stanoven i jako hlavní mechanismus pro nejúčinnější látku, tektorigenin, jehož hodnoty IC_{50} byly 3x nižší než pro standardní látku, kyselinu acetylsalicylovou (ASA). S ohledem na špatnou biologickou dostupnost parentních látek po p.o. podání, z důvodu jejich špatné penetrace buňkami gastrointestinálního traktu a/nebo jejich rychlému metabolismu již v těchto buňkách, byly otestovány i známé isoflavonoidní metabolity. Z nich prokázal největší účinek S-equol, který vykazoval na kolagenem navozené agregaci podobný potenciál jako ASA. Dalším účinným metabolitem byl stanoven 4-ethylfenol, který byl schopný částečně inhibovat cyklooxygenázu-1, antagonizovat tromboxanové receptory i ovlivnit homeostázu vápníku. Metabolit O-desmetylangolensin vykazoval celkový účinek nižší, nicméně se stejnými mechanismy účinku jako 4-ethylfenol. Oproti tomu u (2R)-2-(4-hydroxyfenyl) propionové kyseliny nebyl pozorován žádný antiagregační účinek.

S ohledem na farmakokinetiku i ostatních flavonoidů a skutečnost, že tyto metabolity dosahují v plasmě vyšších koncentrací než parentní látky, byly otestovány i flavonoidní metabolity tvořené lidskou mikroflórou. Pouze 4 látky z 29 byly schopné inhibovat agregaci navozenou AA, a to 4-metylkatechol, pyrogallol, resorcinol a floroglucinol. Hodnoty IC_{50} u 4-metylkatecholu jsou jak pro agregaci navozenou AA, tak i kolagenem přibližně 10x nižší než pro ASA. Tato látka byla schopná částečně inhibovat tromboxan syntázu, ale jako hlavní mechanismus účinku předpokládáme ovlivnění kinetiky vápenatých iontů. 4-metylkatechol a floroglucinol jsou mimo jiné prokázanými metabolity nejčastěji se vyskytujícího se flavonolu kvercetinu. Účinek 4-metylkatecholu a pyrogallolu byl potvrzen i na novém *in vivo* (*ex ovo*) modelu trombózy. Agregace zde byla navozena lokálním podáním AA, kde po první hodině zemřelo 46 % kontrolních vzorků a po 24 hodinách 60 %. I.v. premedikace ASA snížila úmrtnost na 7 %, respektive 27 %. Premedikace 4-metylkatecholem a pyrogallem nebyla v první hodině spojená s žádnou mortalitou, po 24 hodinách to bylo 7 %, respektive 31 %.

Součástí této dizertační práce bylo i otestování antiagregačních účinků nově nasyntetizovaných látek ze skupiny derivátů xanten-3-onů. Z 12 testovaných látek byly téměř všechny schopny významně inhibovat agregaci navozenou AA při koncentraci 80 μ M. V nižších koncentracích byly účinné dvě látky, které byly dále testovány. 9-(2'-hydroxy-5'-bromofenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanten-3-on inhiboval rekombinantní ovčí cyklooxygenázu-1, ale tento účinek nebyl potvrzen v prostředí lidské plasmy obohacené o destičky. Druhá látka, (9-(4'-dimethylamino-fenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanten-3-on, byla nejvíce aktivní na kolagenem navozené agregaci, a to dokonce ve srovnatelných koncentracích jako ASA. Její mechanismus účinku byl následně stanoven jako antagonismus na tromboxanových receptorech.

Závěrem lze shrnout, že tyto publikované práce týkající se polyfenolických látek, které tvoří součást naší potravy a jejich gastrointestinálních metabolitů, naznačují možné protektivní účinky na kardiovaskulární systém. Nicméně u neaktivnějších látek je stále prostor k získání nových informací, především jejich farmakokinetiky a posléze jejich *ex vivo* či dokonce *in vivo* kombinací s klinicky používanými antiagregačními látkami.