UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

Ovlivnění aktivace krevních destiček polyfenolickými látkami a jejich metabolity

DISERTAČNÍ PRÁCE

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

Hradec Králové 2019

Mgr. Lenka Applová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele doc. PharmDr. Přemysla Mladěnky, Ph.D. Uvedená literatura a další zdroje, z nichž bylo při psaní práce čerpáno, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a jsou v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové …… .....

Mgr. Applová Lenka

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za vedení a cenné rady během celé doby mého studia. Mé poděkování bych ráda směřovala i ostatním členům nejen skupiny Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie, ale i členům Katedry farmakologie a toxikologie. Jmenovitě především Janě Karlíčkové, Marušce Vopršálové, Jiřímu Janouškovi, Lucce Zemčíkové a Ondrovi Martincovi, kteří se mnou sdíleli všechny strasti i radosti s postgraduálním studiem spojené.

Poděkování patří i finanční podpoře, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Univerzitě Karlově (GAUK 253115 C a 1080217 C, SVV 260 414. PROVOUK 170/11/1108-2) a Grantové agentuře České republiky (projekt P303/12/G163, 17-05409S,18-00121S). A v neposlední řadě bych ráda poděkovala všem dárcům krve.

Ovšem ten největší dík bych ráda věnovala své rodině a příteli Tomáši Sýkorovi, bez jejichž psychické podpory a porozumění by tato práce nikdy nevznikla.

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 zaujímají 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 dizertační práce bylo zjistit, zda mohou polyfenolické látky, zejména (iso)flavonoidy a/nebo jejich metabolity, ovlivnit agregaci krevní 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 pomocí 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 standartní 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-etylfenol, 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 (2RS)-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 úmrtnosti na 7 %, respektive 27 %. Premedikace 4-metylkatecholem a pyrogallolem 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 µM. 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´-dimetylamino-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 nejaktivnějších 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.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate:	Applová Lenka, MSc.
Supervisor:	Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, PharmD., Ph.D.
Title of Doctoral Thesis:	The influence of polyphenolic compounds and their metabolites on platelet activation

Blood aggregation is a very difficult and complex process, in which platelets play crucial role. On the other hand, their activation is excessive and therefore undesirable under pathophysiological conditions. Cardiovascular diseases are the most common cause of mortality in developed countries and unfortunately, despite significant advances in treatment, the Czech Republic remains in mortality from these diseases behind most Western European countries. Epidemiological studies suggest, that higher intake of (iso)flavonoids is associated with reduced cardiovascular mortality. It is also worth mentioning, that the Czech Republic is among European countries with the lowest content of flavonoids in diet.

The aim of this doctoral thesis was to find out, if polyphenolic compounds, especially (iso)flavonoids and/or their metabolites, are able to influence platelet aggregation and thus indirectly to support epidemiological findings, i.e. whether there may be a link between these substances and possible positive cardiovascular effect at experimental level.

In summary, 16 isoflavonoids, 4 isoflavonoid metabolites, 29 flavonoid metabolites and 12 synthetic xanthen-3-ones were tested in this thesis. At first, the screening was performed on aggregation induced by arachidonic acid (AA) and collagen with using of impedance aggregometry in whole human blood. In the case of very active substances, the mechanism of action was also tested: determination of cyclooxygenase-1 and thromboxane synthase inhibition, antagonism at thromboxane receptors, calcium signalling cascade interference or serotonin release inhibition. These experiments were performed principally by ELISA determination of final products or again by impedance aggregometry.

First, the antiplatelet potential of isoflavonoids, which were the most effective flavonoids in previous studies, was tested. The good inhibitory effect of genistein and daidzein has been confirmed, but now also in whole human blood, i.e. under more clinically relevant biological conditions. Subsequently, these compounds inhibited platelet cyclooxygenase-1 and acted as antagonists at thromboxane receptors. Antagonism at these receptors has also been established as the major mechanism for the most potent compound, tectorigenin, whose IC_{50} values were three times lower than that of the standard, acetylsalicylic acid (ASA). Due to the poor bioavailability of parent compounds after oral administration due to their poor penetration into the gastrointestinal cells and/or their rapid metabolism in these cells, the proven isoflavonoid metabolites were tested. Of these, *S*-equol has shown the greatest effect that was similar to ASA on collagen induced aggregation. Another active metabolite was 4-ethylphenol, which was able to partially inhibit cyclooxygenase-1, antagonize thromboxane receptors and affect calcium homeostasis. The metabolite O-desmethylanolensin showed a lower effect, but shares the same mechanisms of action with 4-ethylphenol. In contrast, no antiplatelet effect was observed for (2RS)-2-(4-hydroxyphenyl) propionic acid.

Based on pharmacokinetics of flavonoids and the fact, that these metabolites reach higher concentrations than parent flavonoids in plasma, these GIT metabolites were also tested. Only four compounds from 29 were able to inhibit platelet aggregation induced by AA; 4-methylcatechol, pyrogallol, resorcinol and phloroglucinol. IC_{50} of 4-methylcatechol were approximately ten times lower than for ASA, both for aggregation induced by AA and by collagen. This compound was able to partially inhibit thromboxane synthase, but we assume that the main mechanism of action is based on influence on calcium kinetics. 4-methylcatechol and phloroglucinol are among other proven metabolites of the most commonly occurring flavonol quercetin. The effects of 4-methylcatechol and pyrogallol were also confirmed in a new *in vivo (ex ovo)* model of thrombosis. In this experiment, platelet aggregation was induced by local (topical) administration of AA. This resulted in 46 % mortality of the control samples after the first hour and 60 % after 24 hours. I.v. premedication with ASA reduced the mortality to 7 % and 27 %, respectively. Premedication with 4-methylcatechol and pyrogallol was not associated with any mortality in the first hour. The corresponding values after 24 hours were 7 % and 31 %, respectively.

A part of this thesis was also testing of the antiplatelet effects of newly synthesized compounds from the group of xanthene-3-one derivatives. From 12 tested substances, almost all were able to significantly inhibit AA induced platelet aggregation at a concentration of 80 µM. Only two compounds were active in lower concentrations and were subsequently tested more in

depth. 9-(2'-hydroxy-5'-bromophenyl)-2,6,7-trihydroxyxanthene-3-one inhibited ovine recombinant cyclooxygenase-1, but this effect was not confirmed in human platelet rich plasma. The second compound, (9-(4'-dimethylamino-phenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanthen-3-one, was very active on collagen induced aggregation. In fact, its activity was even comparable with ASA. The mechanism of action was subsequently established as antagonism at thromboxane receptors.

In conclusion, these published outcomes on polyphenolic substances, that form part of our diet and their gastrointestinal metabolites, suggest possible protective cardiovascular effects. However, for the most active substances there is still space for new information, especially their pharmacokinetics, and then their testing *ex vivo* and *in vivo* in combinations with clinically used antiplatelet agents.

Obsah

1 ÚVOD 1

2 TEORETICKÁ ČÁST 2

2.1 Krevní destičky (trombocyty) 2

2.1.1 Strukturní komponenty 3

2.1.2 Destičková membrána a její receptory 8

2.1.3 Primární hemostáza (agregace trombocytů) 10

2.1.4 Patofyziologické procesy a trombocyty 15

2.1.5 Úskalí antiagregačních léčiv 16

2.2 Polyfenolické látky (Polyfenoly) 19

2.2.1 Kumariny 20

2.2.2 Flavonoidy 21

2.2.3 Lignany 24

2.2.4 Stilbeny 25

2.2.5 Fenolické kyseliny 25

2.3 Metabolismus flavonoidů 27

2.4 Biologické účinky polyfenolických látek 30

3 CÍL PRÁCE 34

4 RECENTOVANÉ ODBORNÉ PUBLIKACE S IMPAKT FAKTOREM, KTERÉ SE VZTAHUJÍ K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE 35

4.1 The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid 35

4.2 9-(4´-dimethylaminophenyl)-2,6,7-trihydroxy-xantene-3-one is a potential novel antiplatelet drug which antagonizes the effect of thromboxane A_2 36

4.3 The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper 37

4.4 Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo 38

5 KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝCH PRACEM 39

6 PODÍL KANDIDÁTA NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH 47

7 SEZNAM TABULEK 48

8 SEZNAM OBRÁZKŮ 49

9 SEZNAM ZKRATEK 50

10 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH ODBORNÝCH PRACÍ 51
10.1 Recenzované publikace v časopisech s impakt faktorem 51
10.2 Přednášky na konferencích 53
10.3 Posterové prezentace na konferencích 54
11 POUŽITÁ LITERATURA 56
12 PŘÍLOHY 66
12.1 Publikace vztahující se k tématu disertační práce aktuálně v recenzním řízení 66

1 ÚVOD

Kardiovaskulární (KVS) onemocnění jsou hlavní příčinou mortality a morbidity ve většině vyspělých zemí. Navíc zvyšování kvality a dostupnosti zdravotní péče v rozvojových zemích zvýšilo výrazně i výskyt těchto onemocnění celosvětově.

Prevalence výskytu jednotlivých onemocnění se liší nejenom mezi kontinenty, ale se statistickou významností i mezi jednotlivými státy. Mezi faktory, které se na tomto jevu podílejí, hraje významnou roli i složení potravy a množství polyfenolických látek, které jsou v této stravě obsažené. O významu a biologických účincích těchto polyfenolických látek se dlouhodobě diskutuje, zatím ale neexistují jasné přímé důkazy. Epidemiologické studie ale naznačují jejich vliv, např. je zdokumentována nižší incidence KVS chorob u japonské populace, která ve zvýšené míře konzumuje sójové produkty a je tedy vystavena vyššímu obsahu isoflavonoidů (Sagara et al. 2004).

Srážení krve je velice složitý a komplexní pochod, ve kterém hrají krevní destičky klíčovou úlohu při prevenci krevních ztrát, nicméně při některých onemocněních je jejich aktivace nadměrná, a tudíž nežádoucí. Jedním z těchto případů jsou arterie zasažené aterosklerózou. Obsah aterosklerotického plátu je velice protrombogenní a jeho porušení může vést k akutnímu koronárnímu syndromu nebo cévní mozkové příhodě (Handin 1996, Ruggeri 2002, Jurk et al. 2005). Klinická terapie antiagregancii se potýká se selháním léčby a/nebo rezistencí a také řadou nežádoucích účinků (McNicol et al. 2003, Michelson 2004, Mortensen et al. 2010). Pochopení vlivu polyfenolických látek na krevní srážení by mohlo vést k optimalizaci antiagregační terapie, včetně možné redukce stávajících dávek léčiv. Vše zmíněné by mělo pozitivní dopad především na pacienta.

Antiagregační potenciál některých polyfenolických látek byl již popsán, ale informace se s ohledem na různé podmínky experimentů rozcházejí. Navíc ve většině *in vivo* experimentů nebyl brán zřetel na jejich farmakokinetiku. Obecně mají tyto látky velmi malou biologickou dostupnost (Walle 2004). Jejich metabolismem vzniká celá řada jiných fenolických látek (např. malých fenolických kyselin či hydroxybenzenů), které se dostávají zpět do systémové cirkulace v nezanedbatelných koncentracích (Kim et al. 1998, Crozier et al. 2010). Proto jsme se v této práci zaměřili na komplexní posouzení antiagregačního účinku jak vybraných parentních látek, tak i jejich metabolitů. Cílem této práce bylo mimo jiné poskytnout celistvější pohled na danou problematiku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Krevní destičky (trombocyty)

Lidské krevní destičky neboli trombocyty, jsou malé bezjaderné útvary vznikající v kostní dřeni z polyploidní kmenové buňky, tzv. megakaryocytu odškrcováním její periferní cytoplasmy, kdy z jednoho megakaryocytu může vzniknout až 5 000 trombocytů (Harrison et al. 1993, McNicol and Israels 2003, Jurk and Kehrel 2005). Jsou to druhá nejpočetnější tělíska v lidské krvi, fyziologické hodnoty se pohybují od 150 do $450x10^9$/L a zajímavé je, že jejich počet není ovlivněn pohlavím (McNicol and Israels 2003, Harrison 2005). Délka jejich života, respektive schopnost plnit své funkce se vzhledem k absenci jádra pohybuje pouze mezi 7 až 10 dny. Existují jako bikonkávní disky o průměru 2-4 µM ± 0,5 µM (McNicol and Israels 2003, Harrison 2005) a jejich střední objem (mean platelet volume, MPV) se pohybuje mezi 7-11 fL (Harrison 2005). Řada studií prokázala, že tato hodnota je u pacientů s akutním koronárním syndromem nebo i ischemickou chorobou vyšší, dokonce koresponduje i se závažností stavu. Bohužel tato veličina nemůže být používána v diagnóze s ohledem na velkou variabilitu (pohlaví, věk, jiná onemocnění atd.) a také malé rozdíly mezi naměřenými hodnotami (Noris et al. 2016).

V cytoplasmě trombocytů dochází ke glykolýze glykogenu, kterého se zde nachází větší množství. Jsou zde přítomné také mitochondrie, ve kterých vzniká ATP z ADP oxidační fosforylací. ATP nezbytné mimo jiné pro degranulaci granul trombocytu (Rendu et al. 2001, McNicol and Israels 2003).

Ačkoliv jsou destičky bezjaderné, jsou i schopné syntetizovat vlastní proteiny. Před vytvořením nové destičky z megakaryocytu jsou do její cytoplazmy přesunuty společně s dalšími komponenty i specifické pre-mRNA a ribozomy, nicméně stále se o těchto procesech ví poměrně málo a výzkum v této oblasti stále pokračuje (Weyrich et al. 2009).

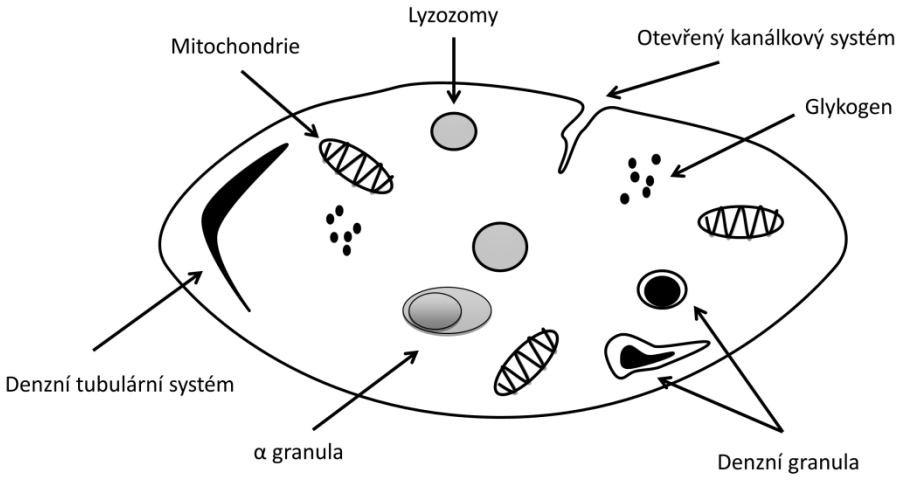
2.1.1 Strukturní komponenty

2.1.1.1 Skeletární systém destiček

V oblasti, kterou nazýváme jako *oblast solubilního gelu*, se nacházejí mikrotubuly a aktinová vlákna, tedy skeletární komponenty trombocytů. Ty jsou nezbytné při degranulaci sekrečních granul (McNicol and Israels 2003) a také při vytváření panožek (pseudopodií) po aktivaci destiček. V tomto stavu dochází k silné reorganizaci skeletárního systému, polymerizaci aktinu a fosforylaci myozinu. Změna tvaru a zvětšení povrchu destiček je důležitým faktorem při jejich adhezi a degranulaci. Rychlost a intenzita je závislá na délce a síle aktivace destiček (Rumbaut et al. 2010).

2.1.1.2 Membránový systém

Membránový systém destiček je složený ze dvou částí. Jedná se o otevřený kanalikulární (kanálkový) systém a denzní tubulární systém (White 1972, Harrison and Cramer 1993). Schematicky jsou znázorněny společně s dalšími komponentami trombocytu na obr. č. 1.



Obrázek č. 1. *Zjednodušená struktura trombocytu.*

Upraveno dle McNicol 1997, Rendu and Brohard-Bohn 2001.

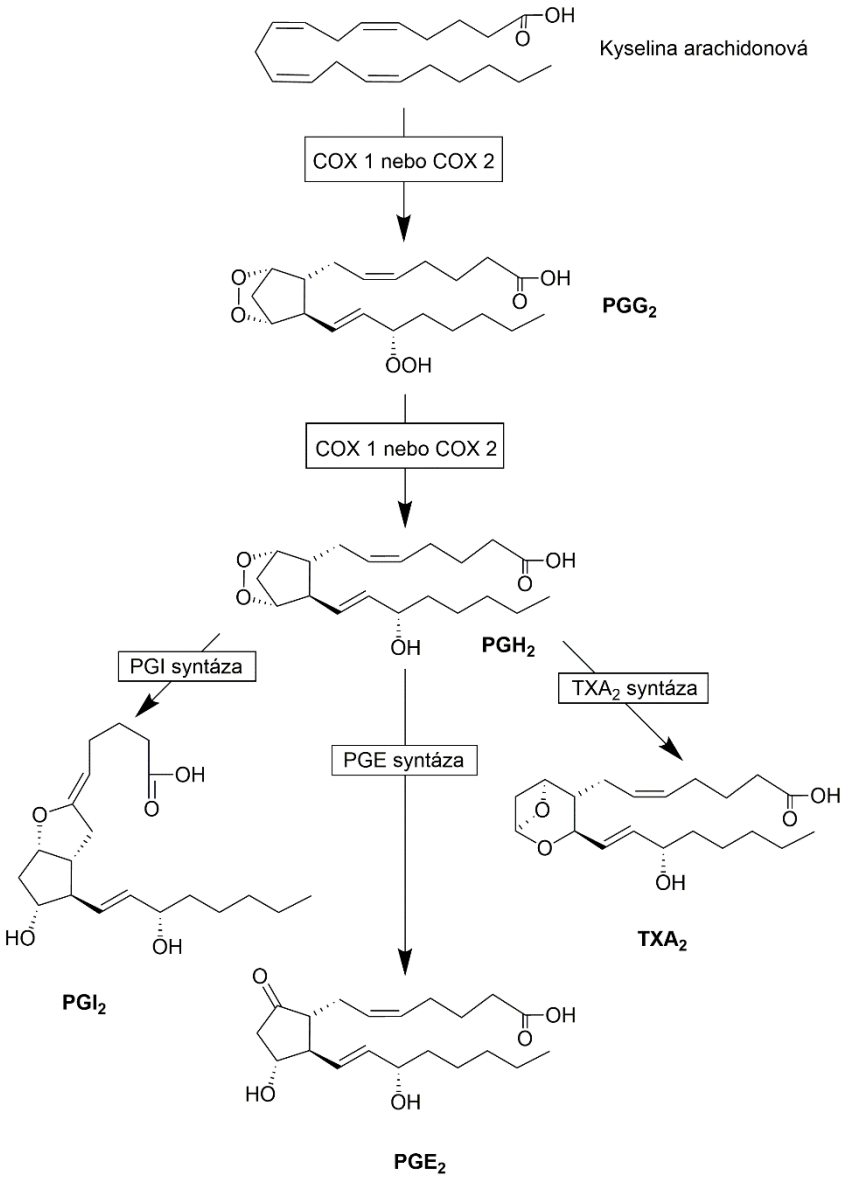
Kanálkový systém (open canalicular system, OTS) vzniká vychlípením destičkové membrány a zvyšuje tedy celkový povrch trombocytu (White 1972). Jedná se o síť kanálků procházející cytoplasmou, jejíž hlavní úlohou je zprostředkování komunikace, výměny látek mezi vnějším prostředím destičky a jejím lumen. Během aktivace trombocytů se jedná o jakési „potrubí“, které umožní degranulaci (White 1972, Harrison and Cramer 1993, Rendu and Brohard-Bohn 2001). Kanálky jsou propojené navzájem a současně také spojeny s denzním tubulárním systémem (White 1972).

Denzní tubulární systém (dense tubular system, DTS) je endomembránový systém, který pochází z endoplasmatického retikula mateřského megakaryocytu (White 1972, Rendu and Brohard-Bohn 2001). Nachází se v blízkosti cytoplasmatické membrány a mikrotubul a jeho hlavní úlohou je zásobárna iontů vápníku a enzymů důležitých pro kontrolu a aktivaci krevních destiček (Rendu and Brohard-Bohn 2001, McNicol and Israels 2003). Tubuly jsou naplněné amorfním materiálem, který se složením podobá cytoplasmě (White 1972, Rendu and Brohard-Bohn 2001).

V těchto tubulech dochází k hlavní části biosyntézy prostanoidů destiček. Nachází se zde fosfolipáza A_2, cyklooxygenáza (COX-1) a tromboxan syntáza, které katabolizují přeměnu kyseliny arachidonové (AA) na tromboxan A_2. Tato syntéza bývá často chybně považována za reakci sekreční - tromboxan je opravdu poté vylučován do okolí destičky, ale jeho syntéza je započata až po aktivaci trombocytu (Rendu and Brohard-Bohn 2001, McNicol and Israels 2003). Tato metabolická aktivita je primárním cílem současné protidestičkové terapie. Metabolismus AA je znázorněn na obr. č. 2.

DTS se také podílí na vylučování dvou velice důležitých regulátorů destičkové aktivace: Ca^{2+} a adenylátcyklázy, které jsou zde uložené. Obsah vápníku tvoří přibližně 30 % celkového množství v trombocytu a jeho mobilizace začíná jeho uvolněním do cytoplasmy, kde aktivuje řadu kalcium-dependentních enzymů (fosfolipázu A_2, lehkořetězcovou myozinkinázu, atd.) (Rendu and Brohard-Bohn 2001, McNicol and Israels 2003). Ukládání vápníku je kontrolováno sofistikovaným systémem ATPázových pump v membráně DTS (nazývaných jako u jiných organel SERCAs – sarkoplasmatic endoplasmatic reticulum calcium ATPases). Tyto vápníkové ATPázy jsou kontrolovány koncentrací cytosolového cAMP. Stav aktivace krevní destičky je závislý na rovnováze koncentrací mezi cytosolovým Ca^{2+} a cAMP; cAMP udržuje Ca^{2+} uvězněný v DTS a jakýkoliv jeho pokles vede k vyplavení Ca^{2+} do cytosolu a i aktivaci destičky. Toto vyplavení vápenatých iontů je rozhodující faktor degranulace a sekrece destičkových

granul (Rendu and Brohard-Bohn 2001). Stabilizace destiček dostatečným množstvím cAMP je i jedním z možných terapeutických zásahů u antiagregačních léčiv.



Obrázek č. 1. *Schematické znázornění metabolismu kyseliny arachidonové vedoucí k různým prostaglandinům.*

TXA_2, tromboxan A_2; PGG_2, prostaglandin G_2; PGH_2, prostaglandin H_2; PGI_2, prostacyklin; PGE_2, prostaglandin E_2.

2.1.1.3 Sekreční granula

Každá skupina destičkových granul má specifický účel, související s tím, jaké látky obsahuje. Podle těchto obsahových látek a jejich účinku je můžeme rozdělit:

Denzní granula patří mezi nejmenší granula nacházející se v trombocytu (průměr přibližně 150 nm), ale díky svému vzhledu jsou pod mikroskopem dobře rozpoznatelná. Neprůhledný střed granul je obklopen čirým, průsvitným prostorem a jednoduchou membránou. Jejich tvar nemusí být vždy stejný, pohybuje se od kulovitého, oválného až po tvar připomínající pulce (viz obr. č. 1). Tato granula obsahují malé, neproteinové molekuly, které jsou vylučovány za účelem aktivace okolních destiček. Jedná se především o velké množství ADP a ATP (přibližně v poměru 1:5), což je přesně opačný poměr než v celé destičce (Rendu and Brohard-Bohn 2001).

Denzní granula slouží především jako hlavní zásobárna pro 5-hydroxytryptamin neboli serotonin. Jeho koncentrace zde dosahuje hodnot až 65 mM (Rendu and Brohard-Bohn 2001). Z tohoto důvodu byla tato granula původně nazývána jako 5-hydroxytryptaminové organely. Vysoká koncentrace zde ale není jen serotoninu, ale také Ca^{2+}, která je přibližně 100x větší než v cytosolu destičky. Tato zásoba se ale nevylučuje při aktivaci destiček, jak je tomu u denního tubulárního systému (Rendu and Brohard-Bohn 2001). Látky obsažené v granulích, tedy především nukleotidy, Ca^{2+} a serotonin, vytvářejí dohromady komplex, který je pospolu držen intramolekulárními silami (Pletscher et al. 1971). Vápník je v tomto komplexu v neionizované formě a přispívá ke stabilizaci granul, stejně tak jako serotonin (Rendu and Brohard-Bohn 2001). K vysoké stabilitě těchto granul přispívá i vysoká koncentrace fosforu (Skaer et al. 1974).

Populace α granul je daleko rozličnější. Jsou to velké organely přibližně 200 až 500 nm velké s jednoduchou membránou (Harrison and Cramer 1993, Rendu and Brohard-Bohn 2001). Jejich tvar je buď kulovitý, nebo oválný a můžeme rozlišit dva hlavní kompartmenty (Rendu and Brohard-Bohn 2001); tmavé jádro, obsahující proteoglykany, a šedou matrix (Suzuki et al. 1990). Šedá matrix může být ještě dále rozdělena na část blízce sousedící s jádrem, zónu střední a malou periferní zónu, která je charakteristická přítomností tubulárních struktur. V nich se nacházejí velké proteiny jako von Willebrandův faktor nebo faktor V (Hayward et al. 1995). V nezralých megakaryocytech jsou α granula malá a zvětšují se společně s jejich vývojem. Některé proteiny α granul jsou syntetizovány endoplasmatickým retikulem megakaryocytu, jiné

musí být absorbovány endocytózou (Harrison and Cramer 1993, Rendu and Brohard-Bohn 2001). Molekuly, které se nachází v malé koncentraci jako imunoglobuliny nebo albumin, se dostávají do granul pasivní endocytózou, u látek, kde je koncentrace vyšší než v plasmě, se jedná o endocytózu zprostředkovanou receptorem (Harrison and Cramer 1993, Rendu and Brohard-Bohn 2001).

α granula obsahují velké množství proteinů, které mají důležitou roli v hemostáze, zánětu, ale i následném hojení rány (Rendu and Brohard-Bohn 2001). Mají vlastnosti adhezivní, prokoagulační, jedná se také o proteázové inhibitory či mitogenní faktory (Harrison and Cramer 1993, Rendu and Brohard-Bohn 2001). Jednotliví zástupci jsou uvedeni v tabulce 1.

Z agregačního hlediska je také velice důležitý membránový protein CD62 (P-selektin) na povrchu granul, který se dostává na povrch trombocytu až po jeho aktivaci, tudíž slouží jako jeden z charakteristických znaků aktivace destiček (Harrison and Cramer 1993, Jurk and Kehrel 2005).

Lyzozomy jsou třetí kategorií těchto sekrečních granul o velikosti od 175 do 250 nm. Jejich vzhled není ničím nápadný jako např. u α granul a musí být využito specifických cytochemických metod na jejich zobrazení. Lyzozomální váčky lze najít ve zrajícím megakaryocytu a s postupem času dochází k jejich spojování a zvyšování četnosti. Obsahují rozdílné koncentrace hydroláz (glykosidázy, proteázy), ale i kationické proteiny s antibakteriální aktivitou. Po aktivaci trombocytu a degranulaci lyzozomů (fúze membrány lyzozomu a trombocytu) se na povrch trombocytu dostává glykoprotein CD 63, který je dalším markerem aktivace krevních destiček (McNicol 1997, Rendu and Brohard-Bohn 2001). Lyzozomy jsou společně s dalšími složkami destiček znázorněny na obr. č. 1.

Tabulka č. 1. *Soupis nejvýznamnějších látek obsažených v destičkových granulích.*

Sekreční granula		
Denzní granula	**α granula**	**lyzozomy**
ADP	Destičkový faktor 4 (PF4)	Glykosidázy
5-HT	Von Willebrandův faktor	Arylsulfatázy
Vápník	β-tromboglobulin (βTG)	Fosfatázy
	Faktor V, VII, XI, XIII	Proteázy
	Fibrinogen	
	Vysokomolekulární kininogen (HMWK)	
	Cytokiny	
	IgG, IgA, IgM	
	Vibronektin, fibronektin	

Upraveno dle Harrison and Cramer 1993, McNicol et al. 1999, Rendu and Brohard-Bohn 2001, McNicol and Israels 2003, Jurk and Kehrel 2005.

2.1.2 Destičková membrána a její receptory

Membránu trombocytu tvoří fosfolipidová dvojvrstva, ve které je rovnoměrně rozložen fosfatidylcholin. Sfingomyelin se nachází ve vnější vrstvě a vysoké koncentrace fosfatidylinositolaminu, fosfatidylcholinu a fosfatidylinositu ve vrstvě vnitřní. Také se zde nachází neutrální lipidy, především cholesterol (McNicol 1997, McNicol and Israels 2003). Mezi ně jsou pak vnořené proteiny, které vytváří receptory (McNicol and Israels 2003). Pro agregaci významné receptory a jejich ligandy nalezneme v tabulce č. 2. Pod tabulkou jsou některé z nich popsány detailněji.

Tabulka č. 2. *Agregačně významné receptory a jejich ligandy.*

Ligand	Označení receptoru
Von Willebrandův faktor	GPIbα (GPIb/IX/V)
kolagen	$\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), GPVI
ADP	$P2Y_1$, $P2Y_{12}$ a $P2X_1$
Trombin	PAR1, PAR4, GPIb
Serotonin	$5\text{-}HT_{2(A)}$
Tromboxan A_2	TXA_2 (TPα)
Fibrinogen	GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$)

Upraveno dle McNicol 1997, McNicol and Israels 2003, Harrison 2005, Jurk and Kehrel 2005.

Receptory pro ADP. Na povrchu lidských destiček se nacházejí 3 typy receptorů pro ADP – $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ a $P2X_1$ (McNicol and Israels 2003). Receptor $P2Y_1$ je tzv. Gq receptor, jehož aktivací dochází ke stimulaci fosfolipázy Cβ (PLC β). Tento typ je na povrchu destiček zastoupen nejčastěji. PLC β poté hydrolyzuje fosfatidylinositolbisfosfát (PIP_2) na inositoltrifosfát (IP_3), který uvolňuje Ca^{2+} a aktivuje lehkořetězcovou kinázu, a diacylgrycerol (DAG), který aktivuje proteikinázu C (McNicol and Israels 2003).

Receptor $P2Y_{12}$ je Gi, jeho aktivací dochází k inhibici adenylátcyklázy, tudíž se snižuje tvorba cAMP. Tento proces vede k destabilizaci destičky a podpoření sekrece (McNicol and Israels 2003, Jurk and Kehrel 2005). Tento receptor je běžně známý v nejužším slova smyslu jako ADP-receptor, protože právě na něj se váže řada klinicky používaných léčiv (thienopyridiny - tiklopidin, klopidogrel, prasugrel atd.).

Řada studií prokázala, že $P2X_1$ receptor může zvýšit destičkovou odpověď po aktivaci různými induktory a podporovat vznik trombu (Mahaut-Smith et al. 2011). Jedná se o rychlý, ligandem řízený neselektivní iontový kanál zodpovědný za vnější vstup Ca^{2+}, který pravděpodobně hraje roli ve změně tvaru destičky (Cattaneo et al. 2001, Rumbaut and Thiagarajan 2010). Jako jediný destičkový receptor je aktivován ATP uvolněnou z poškozených tkání anebo z krevních buněk. Farmakologická blokáda tohoto receptoru by mohla poskytnout nové farmakologické možnosti (Mahaut-Smith et al. 2011).

Receptory pro serotonin, $5HT_{2A}$. Jedná se o Gq receptor, po jehož aktivaci dochází k zesílení destičkové odpovědi na ADP (Jurk and Kehrel 2005). Serotonin je také významný vazokonstriktor.

Receptory pro tromboxan jsou také charakteru Gq. Nevyskytují se pouze na trombocytech, ale i monocytech, makrofázích nebo endoteliálních buňkách (Miggin et al. 1998). Navázáním tromboxanu na tento receptor dochází k aktivaci trombocytů a také vazokonstrikci cév. Existují dvě isoformy tohoto receptoru; TP α, která je široce zastoupena v mnoha tkáních, a TP β, který má pouze omezený výskyt (Huang et al. 2004). Na trombocytech se nacházejí pouze TP α (Habib et al. 1999). Zajímavé je, že zvýšený počet receptorů pro tromboxan byl popsán u pacientů s akutním koronárním syndromem (Dorn et al. 1990).

Receptory pro trombin. Trombin je známý zejména jako koagulační faktor ale je také nejsilnějším známým destičkovým aktivátorem (McNicol et al. 1993). Trombocyty exprimují na svém povrchu několik receptorů pro trombin – GPIbα a rodinu PAR receptorů (PAR1, PAR4) (McNicol and Gerrard 1993, Kahn et al. 1999). Aktivace GPIbα vede k rychlejší hydrolýze a aktivaci PAR1. Předpokládá se, že hraje důležitou roli při nízkých koncentracích trombinu (McNicol and Gerrard 1993).

Receptory GPIIb/IIIa spojují aktivované destičky prostřednictvím fibrinogenu. Trombocyt má v klidovém stavu na svém povrchu od 40 do 50 tisíc těchto receptorů, které jsou ale v neaktivované formě (McNicol 1997, Jurk and Kehrel 2005). Po aktivaci krevní destičky a spuštění signálních procesů dochází ke konformačním změnám, které zvyšují afinitu tohoto receptoru k jeho primárnímu ligandu, fibrinogenu. Ten poté funguje jako most spojující jednotlivé trombocyty (Fullard 2004).

2.1.3 Primární hemostáza (agregace trombocytů)

Pokud se v cévě nenachází žádné poranění, setrvávají destičky v tzv. klidovém stavu. Tento stav je udržován endoteliálními inhibičními faktory – tedy prostacyklinem (PGI_2) a oxidem dusnatým (NO) (Michelson 2004). Po narušení endotelu jsou trombocyty schopné místo poranění rozeznat, iniciovat tzv. primární hemostázu, a následně kooperovat se sekundární hemostázou, tedy hemokoagulací (McNicol and Israels 2003). V primární hemostáze rozlišujeme několik fází. *Adhezi*, při které destičky vytvoří v místě

poranění celistvou vrstvu, *agregaci*, tedy vzájemné spojování destiček, a *sekreční fázi*, ve které dochází k vyplavení obsahu destičkových granul.

Tvorba destičkové zátky je iniciována narušením endotelu, a to především vystavením kolagenových vláken a jiných subendoteliálních proteinů, které nejsou ve fyziologickém stavu v krvi dostupné (Michelson 2004, Harrison 2005). Na kolagen se zachytí v krvi cirkulující von Willebrandův faktor, se kterým začnou interagovat destičky z krve prostřednictvím receptoru GPIb/IX/V. Tato vazba ale není příliš silná, zachytí destičku z krevního proudu, ale následně se vazba musí posílit přes další kolagenové receptory (integrin $\alpha_2\beta_1$ a glykoprotein GPVI). Po navázání na tyto receptory trombocyty přechodně přilnou na cévní stěnu a vytvoří celistvou vrstvu (McNicol and Israels 2003, Michelson 2004, Harrison 2005). Vazba kolagenu na GPVI receptor nejenom zpevňuje adhezi destičky, ale i podporuje její sekreci (Jurk and Kehrel 2005). Aby se ale mohly navázat na tuto destičkovou vrstvu trombocyty nové, ještě cirkulující v krvi, musí dojít k intracelulární signalizaci a destičkové aktivaci vedoucí k uvolnění obsahu denzních a α granul a následné aktivaci glykoproteinového receptoru GPIIb/IIIa. Vzájemným propojením těchto receptorů přes fibrinogen dochází ke vzniku destičkové sítě (McNicol and Israels 2003, Michelson 2004).

Navázáním ligandů na receptory GPIb-V-IX a GPVI je uvnitř destičky spuštěna kaskáda signalizačních reakcí, které vedou k vyplavení Ca^{2+} z denzního tubulárního systému do cytosolu (Rendu and Brohard-Bohn 2001). Zvýšená koncentrace volného Ca^{2+} vyvolá velké množství strukturálních a funkčních změn v destičce.

1. Z diskoidního tvaru destičky začínají vyrážet pseudopodia, výběžky, které zvětšují povrch destičky a umožnují tak lepší adhezi. Tyto změny tvaru jsou umožněny díky změnám ve skeletárním sytému destičky (Jurk and Kehrel 2005, Rumbaut and Thiagarajan 2010).

2. Obsah α granul je vypuštěn do lumen otevřeného kanálkového systému, ze kterého je pak sekretován do krevního řečiště (Harrison and Cramer 1993, Rumbaut and Thiagarajan 2010).

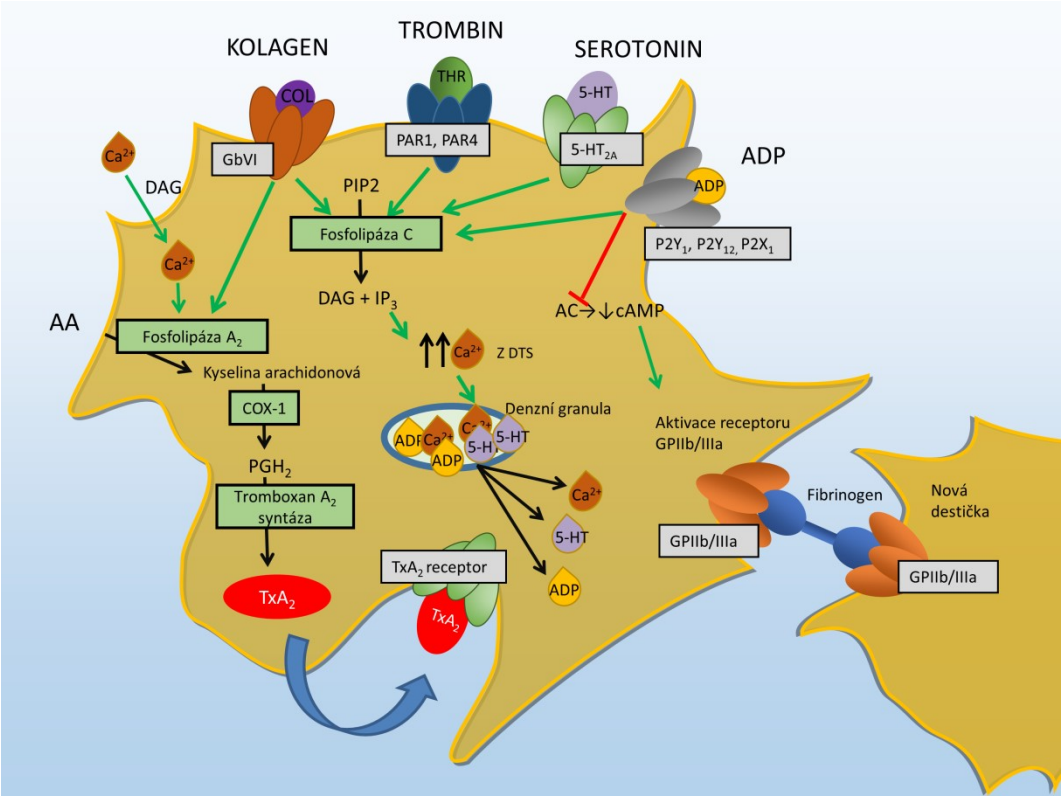
3. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} také stimuluje fosfolipázu A_2 denzního tubulárního systému, která uvolňuje z fosfolipidů membrány AA. Ta je působením COX-1 přeměněna na prostaglandin H_2, který je následně konvertován tromboxan syntázou na tromboxan A_2 (TXA_2) (Rumbaut and Thiagarajan 2010). Schématický je tato syntéza znázorněna na

obr. č. 2. TXA_2 je silným aktivátorem destiček, váže se na tvé receptory na jejím povrchu, ale také je to silný vazokonstriktor, jak bylo uvedeno již výše (Navarro-Nunez et al. 2009).

Vyplavené induktory (ADP, serotonin a následně i TXA_2) posléze aktivují své receptory na povrchu destičky. Receptory spojené s Gq proteiny, tedy pro ADP ($P2Y_1$), TXA_2 a trombin aktivují fosfolipázu β, zatímco receptory spojené s tyrosinkinázovou aktivitou (kolagenový receptor GP VI) aktivují fosfolipázy γ (Varga-Szabo et al. 2008). Aktivace obou těchto receptorů vede ke vzniku DAG a IP_3. DAG zprostředkovává vstup Ca^{2+} z vnějšího prostředí destičky, zatímco IP_3 uvolňuje Ca^{2+} z intracelulárních zásob. Vnitřní sekrece je potencována snížením tvorby cAMP aktivací receptoru $P2Y_{12}$, zatímco vnější vstup Ca^{2+} může být podpořen i aktivací receptoru $P2X_1$ (Rumbaut and Thiagarajan 2010, Mahaut-Smith et al. 2011). Schématický jsou procesy aktivace trombocytů znázorněny na obr. č. 3.

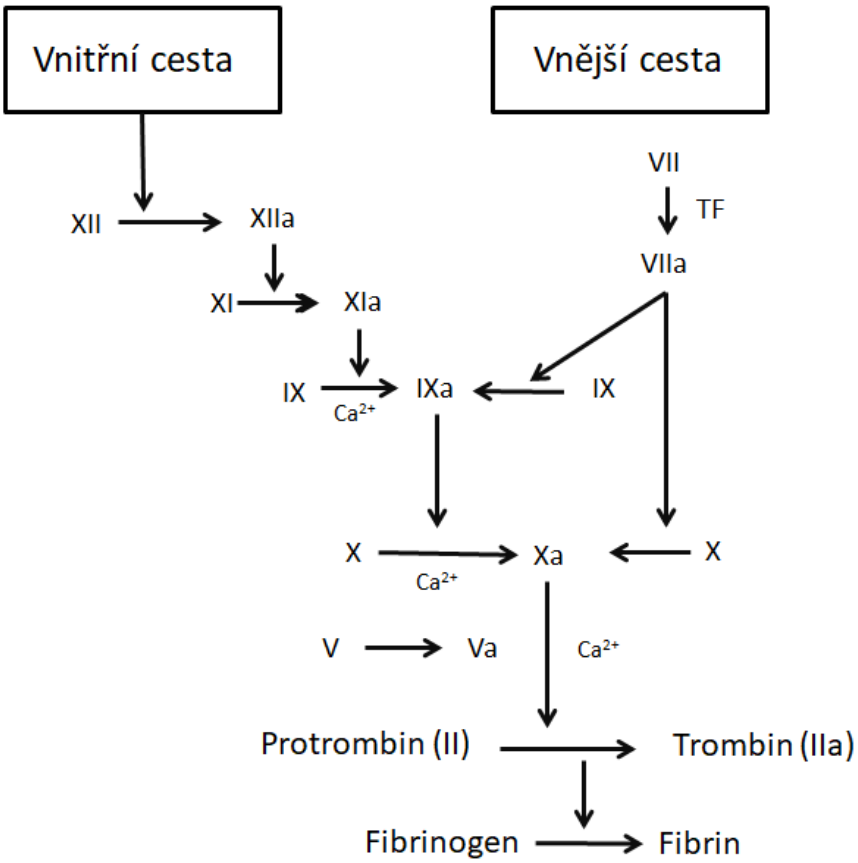
S degranulací α granul se na povrch destičky dostávají i glykoproteiny, P selektin a CD40L, zprostředkovávající vazbu na neutrofily a monocyty (Singbartl et al. 2001, Jurk and Kehrel 2005). Aktivace trombocytů je doprovázena i tzv. flip-flop fenoménem, při kterém se na povrch trombocytu dostávají anionické fosfolipidy, především fosfatidylserin (Jurk and Kehrel 2005). Ty jsou důležité v následných krocích hemokoagulace při vazbě koagulačních faktorů z krve (Sims et al. 1989)

Destičkový trombus, který vznikl interakcí trombocytů s komponenty extracelulární matrix a vzájemnou agregací, není příliš stabilní a je náchylný k rychlé degradaci. Vytvoření stabilní destičkové zátky je charakteristické přeměnou fibrinogenu na vláknitý fibrin a tuto označujeme jako **hemokoagulace.** Přeměna fibrinogenu na fibrin je katalyzována působením trombinu. Ten je tvořen po povrchu destiček a v menší míře na povrchu buněk s lidským tkáňovým faktorem (fibroblasty, aktivované monocyty nebo endotel). Toto množství je velice malé na vytvoření stabilní zátky, ale dostatečné na aktivaci trombocytů (Bouchard et al. 2001). Koagulační faktory jsou přítomné v krvi v nízkých koncentracích a jejich vzájemná interakce je urychlována absorpcí právě na aktivovaný povrch destiček. Celý proces spočívá v kaskádě reakcí, kdy se proenzym aktivuje na enzym a ten poté aktivuje další proenzym (Jurk and Kehrel 2005). Síť, která vznikne polymerizací fibrinových vláken, následně zpevní destičkovou zátku a společně s erytrocyty, které se v této síti zachytí, vytvoří definitivní neboli červený trombus. Zjednodušené schéma koagulační kaskády je znázorněno na obr. č. 4



Obrázek č. 2. *Schématické znázornění aktivace trombocytu.*

Znázorněna aktivace různými induktory agregace, společně s propojeností jednotlivých procesů. Zelené šipky znázorňují aktivační působení, červené inhibiční. Upraveno dle McNicol and Israels 2003, Roberts et al. 2004, Jurk and Kehrel 2005, Rumbaut and Thiagarajan 2010, Sangkuhl et al. 2011.



Obrázek č. 3. *Koagulační kaskáda.*

Zjednodušené schéma aktivace koagulačních faktorů a vzniku fibrinu s ohledem na vnitřní i vnější cestu aktivace. Upraveno dle Jurk and Kehrel 2005, Manook et al. 2018.

2.1.4 Patofyziologické procesy a trombocyty

O zapojení trombocytů v patofyziologických procesech byla již předložena řada důkazů. Trombocyty ovlivňují tonus cév, zánět a nádorové bujení (Harrison 2005, Jurk and Kehrel 2005). Hrají kritickou roli při trombóze v koronárních cévách (Handin 1996, Ruggeri 2002), dalších KVS onemocněních jako cévní mozkové příhodě, periferním cévním onemocněním a/nebo diabetu (Michelson 2002). Zvýšená expozice P-selektinu na povrchu destiček je brána jako rizikový faktor u pacientů s tzv. němým infarktem (Minamino et al. 1998). Nicméně citlivějším a spolehlivějším znakem je nalezení agregátu trombocyt-monocyt jak u stabilních koronárních onemocnění, tak i při akutním koronárním syndromu (Michelson et al. 2001, Michelson 2004).

Ateroskleróza

Ateroskleróza je multifaktoriální, chronické progresivní onemocnění cév, při kterém dochází k místnímu ukládání lipidů do intimy arterií. Tento jev rozvíjí chronický zánět, intima cév reaguje nadměrnou proliferací až do médie tepen (Fuster et al. 1992b, Fuster et al. 1992a). Tato dysfunkce endotelu může být zapříčiněna několika vlivy nebo i jejich kombinacemi. Především se jedná o vysokou hladinu LDL částic v krvi, hypertenzi, diabetes, zvýšenou koncentraci volných radikálů či homocysteinu, ale i působení bakterií (Ross 1999, McNicol and Israels 2003). Tato endoteliální dysfunkce je charakterizována i zvýšenou adhezí leukocytů a trombocytů a ztrátou přirozených antikoagulačních vlastností endotelu. Sama o sobě není ateroskleróza fatální, nicméně celý tento proces vede k vytvoření aterosklerotického plátu s fibrózní čepičkou, který má rozdílnou stabilitu. Pokud dojde k narušení tohoto plátu, subendoteliální matrix je vysoce protrombogenní. Jak bylo uvedeno výše, trombocyty reagují s kolagenními vlákny a von Willebrandovým faktorem a začnou vytvářet zátku, která je velice rychle zpevněná fibrinovými vlákny. Tento trombus je zodpovědný za akutní uzavření cévy a následné ischemické poškození srdce nebo mozku (Ruggeri 2000, Fitzgerald 2001, McNicol and Israels 2003, Harrison 2005, Jurk and Kehrel 2005), tedy dvě nejčastější příčiny mortality a morbidity v západním světě (Ruggeri 2002).

Výskyt aterosklerózy úzce souvisí také s koncentrací LDL částic v krvi. LDL částice mohou být ligandem destičkového GPIIb/IIIa receptoru a modulovat jejich funkce. Tento jev byl popsán i u pacientů, kteří měli předepsanou pravidelnou medikaci statiny, ale jejíž compliance nebyla 100%. I tento jev může přispívat k objasnění vyšší incidence srdečních příhod u non-compliantních pacientů. Větší množství LDL částic v krvi může

vyvolat tzv. destičkovou hyperaktivitu spojenou se vznikem agregátu destička-monocyt, které jsou výrazně zapojené ve vzniku aterosklerotického plátu (Jurk and Kehrel 2005).

Diabetes mellitus

Kardiovaskulární profylaxe je u pacientů s DM druhého typu nezbytná s ohledem na fakt, že umírají z 80 % na makro- a mikrovaskulární komplikace (Coccheri 2007). Navíc byla u těchto pacientů několika studiemi dobře prokázána nižší terapeutická odpověď na ASA. Podle meta-analýzy, není ASA schopná snížit v sekundární prevenci u diabetiků riziko KVS příhod (Antithrombotic Trialists 2002). Ve studii s bezmála 4500 pacienty byla ASA podávána pacientům s DM bez KVS příhod a pacientům s jedním nebo dvěma rizikovými faktory KVS chorob bez DM. Skupině pacientů bez diabetu se signifikantně snížila mortalita i morbidita ve vztahu ke KVS, zatímco u skupiny s DM bylo pozorováno nesignifikantní snížení KVS onemocnění a žádný vliv na úmrtí (de Gaetano et al. 2001, Sacco et al. 2003). Provedená laboratorní vyšetření prokázala vztah zvýšené glykémie a sníženého účinku ASA. Vysoká koncentrace glukózy vede ke glykaci proteinů a snížené acetylaci COX-1 acetylsalicylovou kyselinou (Watala et al. 2005). Anfossi et al. 2008 rozšířili tyto poznatky nejen o hyperglykémii, ale i prozánětlivý stav, hyperlipidémii, sníženou citlivost na NO a zvýšený oxidativní stres.

2.1.5 Úskalí antiagregačních léčiv

Jedním z nejpoužívanějších antiagregačních léčiv je i nadále **acetylsalicylová kyselina (ASA),** celosvětově je známá pod názvem Aspirin®. Přestože byly její antiagregační vlastnosti popsány již v roce 1950 (Miner et al. 2007), je stále hojně používaná a stále hraje významnou roli v primární i sekundární prevenci vzniku akutního koronárního syndromu (Luepker et al. 2015). ASA ireverzibilně blokuje COX-1, a to acetylací serinu 530 v katalytickém místě. Výsledkem je inhibice tvorby tromboxanu A_2 destičkami a prostacyklinu (PGI_2) endoteliálními buňkami (McNicol and Israels 2003, Michelson 2004). Jelikož si destičky nový enzym nemohou nasyntetizovat, trvá tato inhibice po celou dobu jejich života, tedy zmíněných 7-10 dní oproti endoteliálním buňkám, které si nový enzym nasyntetizují záhy.

Analýzou studií bylo prokázáno, že optimální dávky ASA se pohybují mezi 75-150 mg. V USA, pravděpodobně z historického důvodu, jsou dávky od 160 do 325 mg (Bultas 2017). Velice zajímavou a důležitou otázkou není jen velikost dávky, ale i léková forma.

ASA je slabá hydrofilní kyselina, která se absorbuje v nedisociované formě, tzn. v kyselém pH (pH < 3.5), které je fyziologicky přítomné v žaludku a proximální části duodena. Maximální koncentrace ASA se nachází v portálním oběhu, zde probíhá vlastní acetylace destičkové COX-1, jelikož v játrech je většina ASA transformována na kyselinu salicylovou, která již antiagregační efekt nevykazuje. Při užití enterosolventních tablet nebo při zvýšeném pH (především u pacientů léčených inhibitory protonové pumpy – IPP) je ASA ve střevě deacetylována a absorbována z velké části jako kyselina salicylová (Bultas 2017). Tyto poznatky potvrzují i klinické studie s enterosolventními formami ASA, jejichž účinek byl na úrovni placeba (Ikeda et al. 2014, Sundstrom et al. 2017).

ASA nachází svůj význam při primární i sekundární prevenci vaskulárních onemocnění (McNicol and Israels 2003, Coccheri 2010), výrazně snižuje rizika spojená s nadměrnou aktivací trombocytů (Elwood et al. 1991) a také je součástí tzv. duální antiagregační terapie. Bohužel se setkáváme i se značným procentem případů, ve kterých došlo k selhání terapie. V literatuře se také setkáváme s pojmem „aspirinová rezistence“. Při tomto stavu dojde u pacienta, který pravidelně užívá ASA, k cévní příhodě a v jeho krvi nebo moči je nalezena zvýšená hladina TXA_2. Pojmy rezistence a selhání léčby se vzájemně prolínají a občas je těžké je odlišit (McNicol and Israels 2003, Michelson 2004, Derle et al. 2016). Mechanismus této rezistence je pravděpodobně multifaktoriální. Jednotlivé možnosti této rezistence jsou popsány v tabulce č. 3. Pacienti trpící rezistencí na ASA mají několikanásobně vyšší riziko akutního koronárního syndromu (Eikelboom et al. 2002). Slabý antiagregační účinek ASA u pacientů s DM 2. typu byl detailněji popsán v předchozí kapitole 2.3.2.

Další velice rozšířenou skupinou jsou antagonisté na ADP receptorech ($P2Y_{12}$). První léčiva této skupiny (klopidogrel a tiklopidin) se do těla dostávají jako proléčiva, tudíž je jejich léčba spojená s rizikem lékových interakcí (Mugosa et al. 2015). Selhání antiagregační léčby bylo popsáno hlavně pro klopidogrel. Můžeme se setkat i s pojmem „klopidogrelová rezistence“, jejíž možné mechanismy jsou popsány také v tabulce č. 3. Novější léčiva z této skupiny již proléčivy nejsou a nesou nižší potenciál lékových interakcí. Proto jsou dnes volena jako léky volby před klopidogrelem.

Tabulka č. 3. *Možné mechanismy účinku aspirinové a klopidogrelové rezistence.*

	Acetylsalicylová kyselina	**Klopidogrel**
Pacient	Non-compliance pacienta	
Dávka	Poddávkování	
Absorpce z GIT	pH žaludku a proximálního duodena	
Destičkové funkce	Nekompletní inhibice COX Zvýšená tvorba nových destiček	Nekompletní inhibice ADP receptorů Zvýšená tvorba nových destiček
Lékové interakce	Podání některých NSAIDs (ibuprofen), IPP	Atorvastatin, některé IPP (omeprazol, esomeprazol)
Genové polymorfismy	TXA_2 receptor, COX-1, TXA_2 syntáza, GPVI	Receptor pro ADP ($P2Y_{12}$) Cytochrom P450 (2C19)
Jiné vlivy	kouření, obezita, hypercholesterolémie, diabetes atd.	

Upraveno dle Michelson et al. 2001, Juurlink et al. 2009, Mortensen et al. 2010, Wu et al. 2015, Bultas 2017. IPP, inhibitory protonové pumpy

2.2 Polyfenolické látky (Polyfenoly)

V nejširším slova smyslu se dá říci, že to jsou látky, které obsahují aromatický cyklus substituovaný více hydroxylovými skupinami; může se tedy jednat o jednoduché látky, ale i kondenzované cykly či polymerní struktury. Doposud je známo přibližně 8 000 těchto látek (Robbins 2003, Pandey et al. 2009).

Polyfenoly jsou také známé pod názvem polyhydroxyfenoly. Poprvé byl tento termín použit již v roce 1894 (Bate-Smith 1954) a následně dále překlasifikován podle tzv. „definice White-Bate-Smith-Swain-Haslam“ (WBSSH). Ta definuje polyfenolické látky jako (Abdel-Shafy H. I. 2017):

1. ve vodě mírně rozpustné látky s molekulovou hmotností od 500 do 4000 Daltonů
2. látky obsahující více než 12 fenolických hydroxyskupin
3. látky s 5 až 7 aromatickými kruhy o velikosti zhruba 1000 Daltonů

Definice dále uvádí, že polyfenolické látky vykazují jedinečné fyzikálně-chemické chování. To je přisuzováno vysoké molekulové hmotnosti a velkému množství látek, které tuto definici splňují. Polyfenolické látky byly a jsou předmětem zájmu řady výzkumných skupin, a proto vznikla i další definice, „Definice podle Quideaua“. Ta říká, že polyfenolické látky pocházejí z šikimátové a/nebo acetátové (polyketidové) biosyntetické dráhy a mají více než 1 hydroxyskupinu (Quideau et al. 2011). Tato definice je nejširší a i proto jde v současné době zřejmě o nejčastější pojetí tohoto pojmu. Logicky jsou tyto definice v určitém rozporu, a proto se často stává, že některé látky splňují kritéria jedné definice, ale už ne kritéria definice druhé. Každá definice má logicky své nevýhody, např. posledně jmenovaná nezahrnuje syntetické látky, které jsou také často řazeny mezi polyfenoly.

Šikimátová (fenylpropanová) metabolická dráha vychází z erytrosa-4-fosfátu a fosfoenolpyruvátu, tedy z produktů vznikajících při syntéze cukrů. Jejich kondenzací vzniká postupně kyselina šikimová, gallová a následně aminokyseliny fenylalanin a tyrosin (Muir et al. 2011).

Druhou cestou je polyketidová (acetogeninová) dráha, která je založena na kondenzaci jednotek acetylCoA (Abdel-Shafy H. I. 2017).

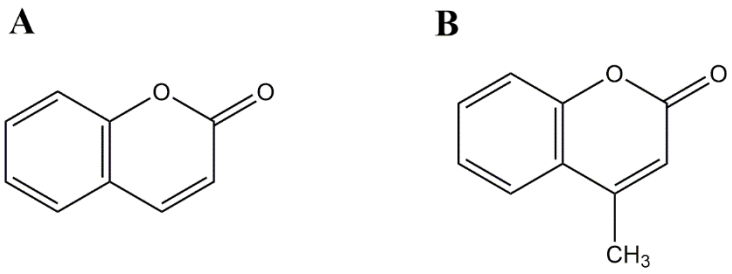
Přirozeně se polyfenolické látky vyskytují jako sekundární metabolity prakticky v každé rostlině. Některé jsou specifické pro danou rostlinu (např. florizin v jablcích), jiné jsou druhově nespecifické jako například kvercetin (D'Archivio et al. 2010). Spotřeba člověkem je tudíž vysoká, počínaje ovocem, zeleninou, ale i rostlinami využívanými ve farmacii a medicíně. Polyfenoly jsou obsaženy i v nápojích od džusů po kávu, čaj či víno. Podílí se na chuti, vůni, barvě i stabilitě.

Následné dělení polyfenolických látek do dílčích skupin nejčastěji zohledňuje jejich základní strukturu. Jedná se o kumariny, flavonoidy, lignany, stilbeny a fenolické kyseliny. Jejich stručné charakteristice a vlastnostem budou věnovány následující kapitoly.

2.2.1 Kumariny

Kumariny představují velkou skupinu derivátu 1,2-benzopyranu (obr. č. 5), které byly identifikovány v řadě přírodních zdrojů (rostlin, hub, ale i bakterií) a také jich byla řada uměle nasyntetizována (Wu et al. 2009). Velice známým derivátem 4-hydroxykumarinu je antikoagulační molekula warfarinu. Mezi nejvýznamnější přírodní kumariny patří dikumarol, umbelliferon, herniarin, aesculetin, psoralen a imperatorin. Nicméně ne všechny kumariny vykazují antikoagulační účinky. Spíše byly popsány účinky antihypertenzní, protinádorové, antibakteriální, protizánětlivé a antiagregační (Chen et al. 1996, Fylaktakidou et al. 2004, Borges et al. 2005, Vilar et al. 2006).

Studiem kumarinů a shrnutím jejích vlastností se naše skupina již zabývala, s ohledem na téma dizertační práce bude ještě část týkající se antiagregačních vlastností rozvedena níže (Macakova et al. 2012, Filipsky et al. 2015, Najmanova et al. 2015).



Obrázek č. 4. *Struktura kumarinů.*

A*: Základní struktura kumarinu,* ***B****: 4-methylkumarin.*

2.2.2 Flavonoidy

Jsou to deriváty benzopyranu, které se nacházejí ve všech fotosyntetizujících rostlinách (Chen et al. 1990). V lidské potravě jich bylo identifikováno přes 4 000, a to především v ovoci, zelenině a řadě nápojů (Russo et al. 2000). Většina flavonoidů se vyskytuje spíše jako glykosidy než aglykony a na základě jejich struktury rozlišujeme několik tříd, strukturně znázorněných na obr. č. 6.

Flavony

Flavony jako apigenin, luteolin, wogonin a baikalein jsou strukturně blízké, v přírodě se četněji vyskytujícím, flavonolům. Nemají ale na rozdíl od nich hydroxylovou skupinu na uhlíku C3. Apigenin a luteolin, jako nejznámější zástupci této skupiny, se vyskytují především v petrželi a celeru. Polymetoxylové flavony se vyskytují také v citrusových plodech (D'Archivio et al. 2007, Del Rio et al. 2013).

Flavonoly

Jsou široce rozšířené celou rostlinnou říší s výjimkou hub a řas. Mezi nejběžnější zástupce patří kaempferol, kvercetin, isoramnetin a myricetin, které se typicky nacházejí ve formě glykosidů (Del Rio et al. 2013). Obsah v rostlinách se může lišit s ohledem na lokální podmínky růstu, sezonní změny atd. V našich podmínkách je nejbohatším zdrojem flavonolů, obzvláště kvercetinu, cibule, brokolice nebo bobulové plody, ale nalezneme je i v červeném vínu nebo čaji (D'Archivio et al. 2007, Del Rio et al. 2013).

Flavanony

Flavanony, jako naringin a hesperetin, jsou charakteristické absencí dvojné vazby v kruhu C a také se vyskytují ve formě glykosidů. Jejich výskyt je spojený především s citrusovými plody, ale i aromatickými bylinami. Hlavními aglykony jsou naringenin v grepfruitech, hesperetin v pomerančích a eriodiktyol v citronech (D'Archivio et al. 2007, Del Rio et al. 2013).

Flavanoly

Flavanoly neboli flavan-3-oly jsou také známé pod názvem katechiny. Může se jednat o jednoduché monomery, oligomery až polymerní proanthokyanidiny, které jsou známé také jako kondenzované taniny. Uhlíky C2 a C3 jsou chirálními centry, existují tedy obecně 4 diastereoisomery. Nejznámějšími zástupci flavanolů v ovoci jsou katechin a epicatechin, zatímco epigallokatechin a epigallokatechin galát se nacházejí obzvláště v čaji (D'Archivio et al. 2007, Del Rio et al. 2013). Proanthokyanidiny jsou zodpovědné za adstringentní charakter grapefruitů nebo některých bobulovin a také nápojů – vína nebo čaje (Rasmussen et al. 2005).

Isoflavonoidy

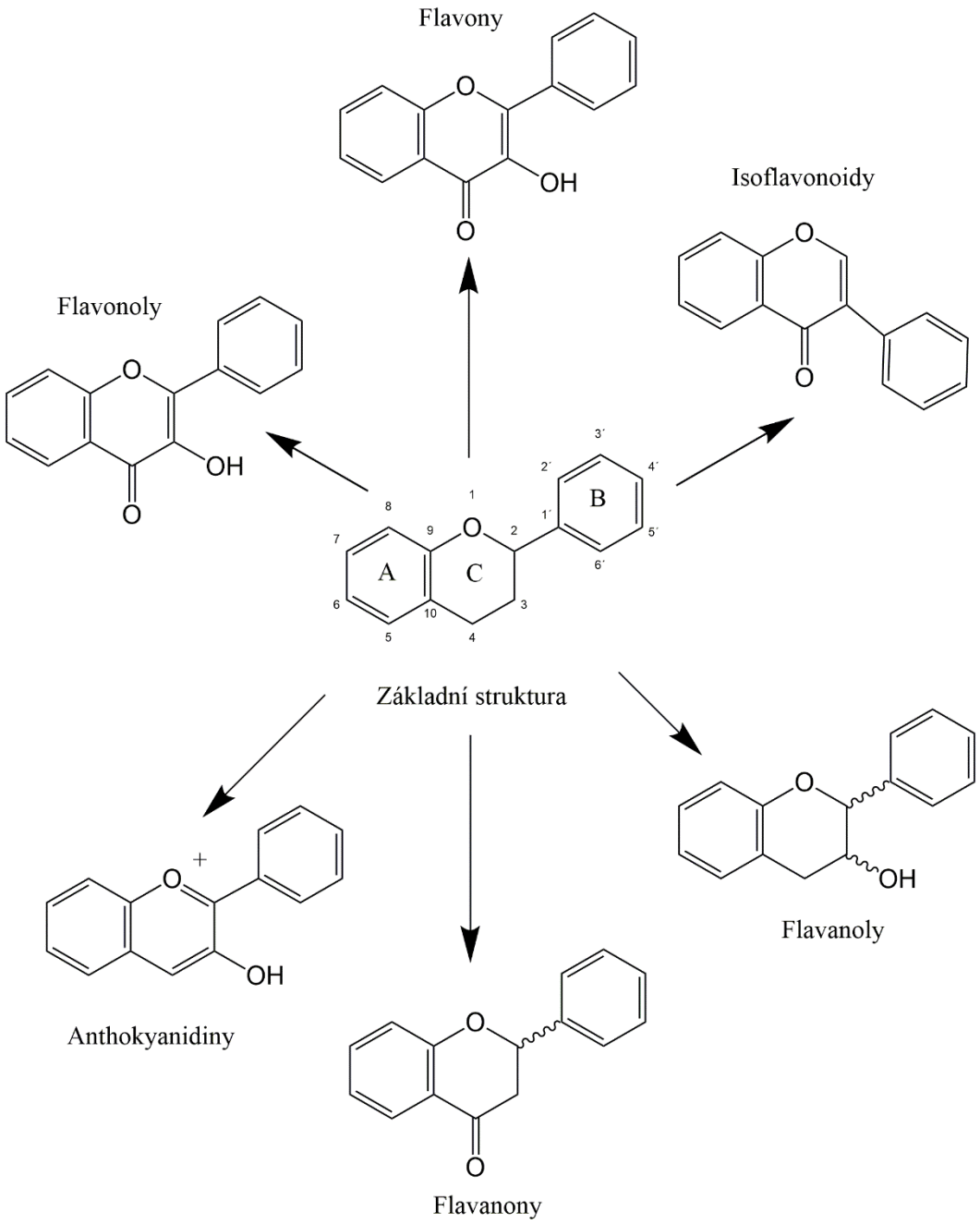
Isoflavonoidy se od ostatních flavonoidů strukturálně liší připojením kruhu B. V jejich případě je tento kruh připojen v pozici uhlíku C3 na rozdíl od ostatních flavonoidů, u kterých se jedná o uhlík C2. Hlavními zástupci (aglykony) jsou genistein, daidzein, biochanin A, tektorigenin a nebo formononetin. V sóji a v produktech z ní se vyskytují především genistein a daidzein, do této doby dva nejstudovanější isoflavonoidy. Nevyskytují se ale jen v sójových produktech, můžeme je nalézt i v červeném jeteli či mungo klíčcích (Boue et al. 2003, Jian 2009). Mohou existovat jako glykosidy, které jsou prakticky biologicky neúčinné a jsou hydrolyzovány v gastrointestinálním traktu na své aglykony. Jelikož vykazují strukturní podobnost s estradiolem a váží se na estrogenové receptory, řadíme je mezi tzv. fytoestrogeny (Cornwell et al. 2004, Del Rio et al. 2013).

U isoflavonoidů byly popsány pozitivní účinky na KVS systém (Kurzer et al. 1997, Pase et al. 2011), účinky antidiabetické (Cornwell et al. 2004), protinádorové (Cornwell et al. 2004, Jian 2009) či antiosteoporotické. Ty posledně jmenované jsou asi dané ovlivněním zmíněných estrogenových receptorů (Boue et al. 2003, Cornwell et al. 2004).

Anthokyanidiny

Anthokyanidiny jsou zodpovědné za zbarvení květů, plodů a semen matečných rostlin (D'Archivio et al. 2007). Mezi nejrozšířenější anthokyanidiny řadíme pelargonidin, cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin a malvidin. Jejich denní příjem je spojený s konzumací bobulových plodů, červeného vína, džusů a také je nalezneme jako součást potravin pod označením E 163 (Manach et al. 2005, Del Rio et al. 2013).

Většina z nich se v lidském těle velice špatně vstřebává, nicméně v tlustém střevě jsou štěpeny bakteriemi na flavonoidní metabolity, které s největší pravděpodobností zprostředkovávají většinu jejich biologických účinků (Williamson et al. 2010).



Obrázek č. 5. *Základní struktury flavonoidních sloučenin.*

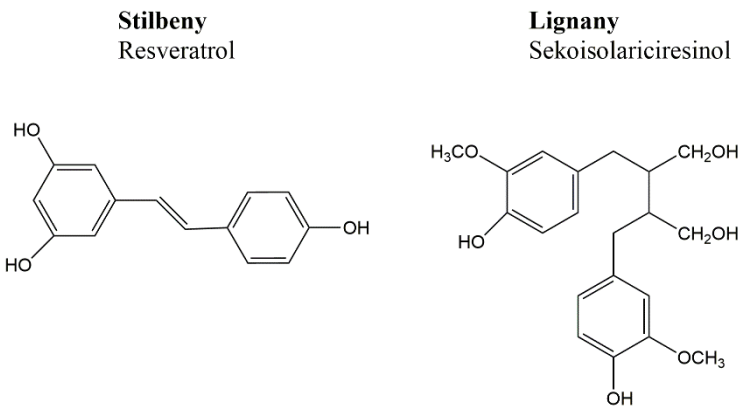
2.2.3 Lignany

Termín lignany je používán pro skupinu dimerů nebo oligomerů fenylpropanu. V přírodě se většinou vyskytují ve volné formě, pouze malé procento jako glykosidy (Cornwell et al. 2004, D'Archivio et al. 2007). Lignany společně se stilbeny a isoflavonoidy patří mezi tzv. fytoestrogeny, tedy látky, které jsou ligandy estrogenových

receptorů. Sekoisolariciresinol (obr. č. 7) a matairesinol jsou ale neaktivními formami a nejdříve musí dojít k jejich přeměně působením bakterií střevní mikroflóry, a to na enterodiol a enterolakton, které již estrogenní aktivitu vykazují. Lignany se nacházejí ve lněných semínících, celozrnném pečivu či čaji (Cornwell et al. 2004).

2.2.4 Stilbeny

Největším zdrojem v lidské potravě je stilben resveratrol (obr. č. 7), přirozeně se vyskytující ve slupkách červeného vína a arašídech. Rostlinami je produkován při stresových stavech, což může být poranění i infekce (Cornwell et al. 2004, D'Archivio et al. 2007, Pandey and Rizvi 2009). Resveratrol je chirární sloučeninou a pouze *trans* izomer je estrogenně aktivní (Cornwell et al. 2004).



***Obrázek č. 6.**. Stilbeny a lignany.*

Chemická struktura nejznámějších zástupců.

2.2.5 Fenolické kyseliny

V některých děleních polyfenolických látek je autoři nazývají jako „neflavonoidní látky“. Tyto přírodní kyseliny se mohou rozdělit do dvou dílčích skupin – deriváty kyseliny skořicové a benzoové (Del Rio et al. 2013).

Mezi deriváty kyseliny (hydroxy)benzoové řadíme kyselinu gallovou a protokatechovou. Kyselina gallová a hlavně její dimer - kyselina ellagová se vyskytuje v rozličném ovoci, především ostružinách (až 38 mg/kg), malinách (až 40 mg/kg). Vysoké

koncentrace obsahují i čajové lístky (D'Archivio et al. 2007, Komorsky-Lovric et al. 2011, Del Rio et al. 2013).

Nejvýznamnějšími deriváty kyseliny skořicové jsou kyseliny p-kumarová, kávová, ferulová a sinapová, které se vzácně nacházejí ve volné formě. Častěji se vyskytují jako glykosidy nebo estery kyseliny chinové, šikimové nebo vinné. Kyselina kávová a kyselina chinová tvoří společně kyselinu chlorogenovou, která je obsažena ovoci a vyskytuje se ve velké koncentraci v kávě či borůvkách. U pravidelných konzumentů kávy může denní příjem přesáhnout i 1 g a být tak pro tyto jedince hlavním potravním polyfenolem (Del Rio et al. 2013). Kyselina kávová je nejčastěji zastoupenou fenolickou kyselinou, zastupující přibližně 75 až 100 % celkového obsahu hydroxyskořicových kyselin ve většině druhů ovoce (kiwi např. obsahuje 1 g/kg čerstvého ovoce) (D'Archivio et al. 2007). Kyselina ferulová je svým výskytem nejhojnější v obilovinách (King et al. 1999, Williamson and Clifford 2010).

Všechny polyfenolické látky, včetně těchto kyselin, jsou štěpeny mikroorganismy a není tomu jinak ani u mikroorganismů lidské střevní mikroflóry. Tímto štěpením vznikají deriváty malých aromatických kyselin; kyseliny propionové, benzoové, fenyloctové anebo i malé hydroxybenzeny (Ostertag et al. 2011). Podrobněji je tento metabolismus rozepsán v následující kapitole.

2.3 Metabolismus flavonoidů

Ačkoliv se zdá, že *in vitro* a *ex vivo* data potvrzují epidemiologické studie o pozitivních účincích flavonoidů, je třeba k těmto výsledkům zahrnout kritičtější postoj. Velká část těchto studií testovala vysoké koncentrace flavonoidů, které neodpovídají dostižitelným koncentracím v organismu. Proto se i v poslední době začíná výrazně uplatňovat zohledňování farmakokinetiky těchto látek, tj. nejen flavonoidů, ale i polyfenolických látek obecně.

Po perorální podání flavonoidů je biologická dostupnost parentních látek nízká. Bylo totiž prokázáno, že parentní flavonoidy se v plasmě nacházejí v prakticky neměřitelných koncentracích (Walle 2004). Jejich biologická dostupnost je ovlivněna řadou faktorů, mj. zdrojem flavonoidů (součást potravy anebo potravní doplněk), konkrétním typem flavonoidu či jejich kombinací, pohlavím, množstvím biotransformačních enzymů nebo i funkčním stavem GIT – především hodnotou pH v žaludku a množstvím bakterií, které se nacházejí v tlustém střevě (Kumar et al. 2013).

Většina flavonoidů se do těla dostává ve formě O-glykosidů, které jsou tak hydrofilní, že nemohou být vstřebány přímo pasivní difuzí ve střevě. Musí být nejdříve hydrolyzovány lidskými intestinálními hydrolázami nebo enzymy mikroflóry, aby mohly být následně vstřebány (Heim et al. 2002, Hanske et al. 2010). Na druhou stranu jsou aglykony hydrofobnější a tudíž mohou být lépe procházet pasivní difuzí přes enterocyty (Day et al. 2000). Po vstupu aglykonů do enterocytů dochází velmi často již na této úrovni ke konjugaci s kyselinou glukuronovou a sírovou (Chen et al. 2014). Glukuronidace jsou nejčastější, následované sulfatacemi a metylacemi. Glukuronidace je katalyzována UDP-glukuronosyltransferázami, které se nacházejí ve střevě i v játrech a jsou zodpovědné za cca 80 % metabolismu flavonoidů lidskými enzymy (Wu et al. 2011). Sulfatace je zprostředkována sulfotransferázami a metylace flavonoidů je dokumentována u katechol-O-metyltransferázy, a to u flavonoidů s katecholovým kruhem B (Wright et al. 2010a, Wright et al. 2010b). Metylované flavonoidy mohou procházet přes membrány pasivní difuzí, glukuronidované a sulfatované flavonoidy však nikoliv. Musí být z buněk odstraněny membránovými transportéry a to buď do krve, žluče, nebo zpět do lumen střeva (Alvarez et al. 2010, Chen et al. 2014). Tyto konjugáty, které jsou zpět vyloučeny do trávicího traktu, postupují společně s flavonoidy, které nebyly absorbované, dále trávicím traktem a podléhají degradaci bakteriemi mikroflóry. Produktem těchto reakcí je řada malých fenolických látek, které se následně vstřebávají

zpět do systémové cirkulace a mohou, a často také dosahují, vyšších koncentrací než parentní flavonoidy (Kim et al. 1998, Crozier et al. 2010). Mezi tyto metabolity patří mimo jiné i deriváty kyseliny hydroxypropionové, hydroxyfenyloctové, hydroxybenzoové a hydroxybenzeny (znázorněny na obr. č. 9) (Erlund 2014) .

Méně je prozkoumán metabolismus dalších fenolických látek v tlustém střevě. Nacházejí se zde např. také bakteriální esterázy, které štěpí deriváty kyseliny (hydroxy)skořicové, které se přirozeně vyskytují právě jako estery a nejsou štěpeny v horních částech GIT (Plumb et al. 1999, Rechner et al. 2001). Volné kyseliny se pak následně vstřebají do systémové cirkulace (Plumb et al. 1999).

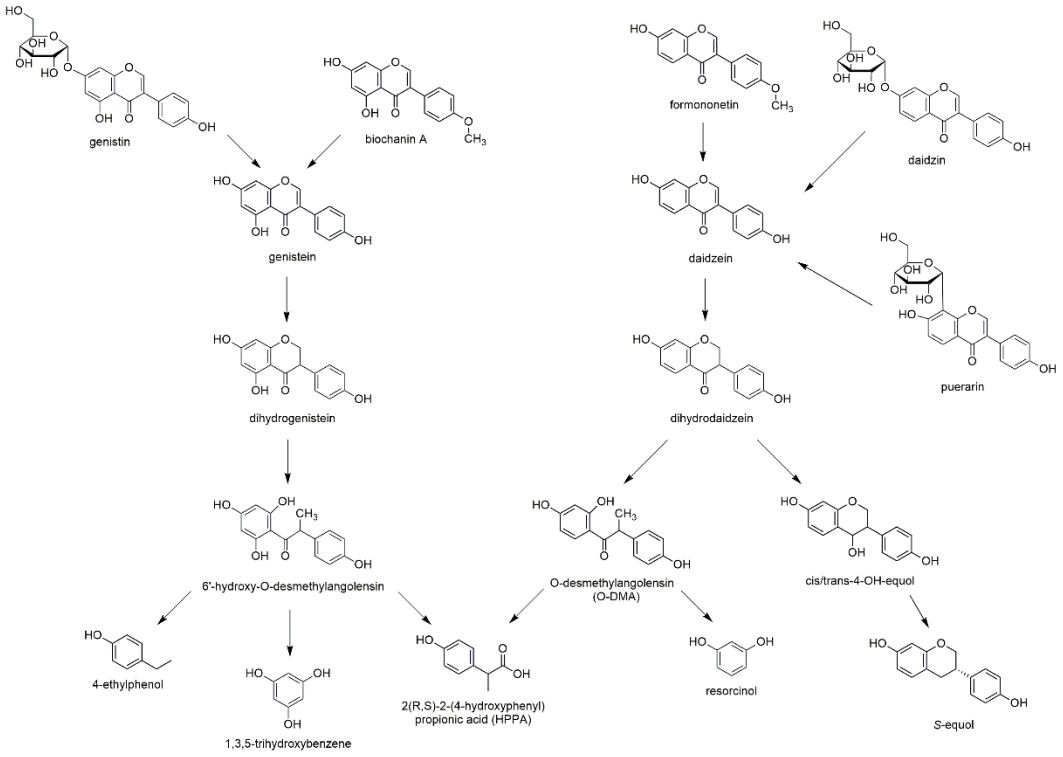
Souhrn těchto dat indikuje, že většina flavonoidů nebo obecně polyfenolů prodělá velice složitý oběh s velice komplexním metabolismem.

Metabolismus isoflavonoidů

Metabolismus isoflavonoidů je částečně odlišný od metabolismu flavonoidů, především s ohledem na vznikající metabolity. Metabolismem daidzeinu (a jeho glykosidu daidzinu), puerarinu a formononetinu vznikají *S*-equol a O-desmetylangolensin (O-DMA), který je následně dále štěpen na (2RS)-2-(4-hydroxyfenyl) propionovou kyselinu a resorcinol jako produkty konečné. Metabolismem isoflavonoidů genisteinu (a jeho glykosidu genistinu) a biochaninu A vzniká 6´-hydroxy-O-DMA jako meziprodukt, který je následně transformován na (2RS)-2-(4-hydroxyfenyl) propionovou kyselinu, floroglucinol a 4-etylfenol (Migkos et al. 2019) (obr. č. 8).

Tyto metabolické cesty potvrzuje mimo jiné i zvýšená hladina *S*-equolu po požití rozličných isoflavonoidních preparátů (koncentrace mezi 0.5 a 1.5 µM) (Setchell et al. 2001, Vergne et al. 2007, van der Velpen et al. 2014). Studie provedená na kravách zaznamenala koncentrace 4-etylfenolu až 6 µM, tedy koncentraci, která byla zřetelně vyšší než koncentrace parentních potravních isoflavonoidů a zároveň i *S*-equolu, který nedosahoval ani 1 µM (Woclawek-Potocka et al. 2005). Přenos těchto dat na savce není možný, ale tato informace naznačuje, že nárůst koncentrace 4-etylfenolu, jako jednoho z konečných metabolitů, je přímo závislá na vstupní koncentraci parentních látek a následných meziproduktů metabolismu. Jinak řečeno to znamená, že tím, jak se

parentní látky a následné meziprodukty metabolizují, klesá jejich koncentrace ve prospěch metabolitů konečných, např. 4-etylfenolu.



Obrázek č. 7. *Zjednodušené schéma metabolické cesty vybraných isoflavonoidů v GIT.*

Upraveno dle Coldham et al. 2002, Rufer et al. 2006, Frankenfeld 2011, publikováno v Migkos et al. 2019.

2.4 Biologické účinky polyfenolických látek

Účely polyfenolických látek v matečné rostlině mohou být rozdílné. Flavonoidní pigmentace chrání rostliny před UV zářením, případně před býložravci, parazity či škůdci (Bate-Smith 1954, Bravo 1998). Některé polyfenoly jsou zodpovědné za charakteristickou chuť. V rostlinách jsou obvykle vázány esterově nebo glykosidicky spíše než ve formě volných sloučenin.

Biologické účinky polyfenolů byly a nadále jsou předmětem rozsáhlého zájmu a výzkumu v rozličných oblastech. Byl popsán účinek antioxidační, protidestičkový, antimikrobiální, protinádorový, antihypertenzní či schopnost ovlivnit metabolismus lipidů (Kurzer and Xu 1997, Boue et al. 2003, Hubbard et al. 2003, Cornwell et al. 2004, Sagara et al. 2004, Kim et al. 2008, Mladenka et al. 2010, Ferrazzano et al. 2011, Pase et al. 2011, Quideau et al. 2011).

S ohledem na téma této dizertační práce bude pozornost v následujících kapitolách věnována současným poznatkům o vlivu vybraných polyfenolických látek na agregaci trombocytů.

Kumariny

Studií analyzujících účinek kumarinů na agregaci trombocytů je velké množství. Jejich porovnávání není jednoduché s ohledem na různé koncentrace induktorů, testovaných látek či standardů, i když ve většině případů byla použita ASA. Také ne vždy byly výsledky vyhodnoceny pomocí IC_{50}.

S ohledem na velmi variabilní chemickou strukturu kumarinů, není překvapením, že tyto látky jsou schopny blokovat agregaci navozenou různými induktory a jejich mechanismus účinku je tedy značně variabilní. Obecně platí, že jejich antiagregační účinek je reverzibilní (Teng et al. 1992, Macakova et al. 2012) s výjimkou inhibitorů fosfolipázy A_2 (Fonseca et al. 2010).

Některé látky z této skupiny blokují produkci tromboxanu, tedy jsou schopné inhibovat COX-1 a/nebo tromboxan syntázu (Teng et al. 1992, Mladenka et al. 2010). Naše skupina prokázala, že 5,7-dihydroxy-4-metylkumariny jsou schopné blokovat COX-1 (dokonce v nižších koncentracích než ASA), ale nejsou účinné proti tromboxan syntáze. Některé tyto látky mají ale dvojí mechanismus účinku, kromě zmínění inhibice COX-1, působí také jako antagonisté na tromboxanových receptorech (Macakova et al. 2012).

Jiné jednoduché kumariny mohou navíc ovlivňovat PAF, trombinem nebo ADP navozenou agregaci (Teng et al. 1992, Chen et al. 1996). Substitucí 1-piperazinylu do polohy 4 vznikají kumariny se silným antiagregačním účinkem, které blokují fosfodiesterázu 3 (Roma et al. 2003). Zajímavým kumarinem je klorikromen, který v plasmě obohacené o destičky inhibuje jejich agregaci jak po přidání ADP, tak i kolagenu, a to navíc ve velice malých koncentracích. Jeho mechanismus účinku je založen na inhibici syntézy a uvolnění PAF i aktivaci fosfolipázy A_2 (Porcellati et al. 1990, Ribaldi et al. 1996).

Isoflavonoidy

V asijských zemích, ve kterých je vysoký příjem sójových produktů, je prokázaný nižší výskyt KVS onemocnění. Bezesporu je pro tento poznatek více důvodů, ale vzhledem ke stravě bohaté na (iso)flavonoidy je nasnadě předpokládat, že zde sehrávají svoji roli (Gottstein et al. 2003, Sagara et al. 2004, Jian 2009). Právě jejich antiagregační potenciál by se mohl podílet na pozitivním vlivu na KVS systém. Nicméně většina dokumentovaných protidestičkových účinků se týká pouze nejznámějších látek genisteinu a daidzeinu. I z tohoto důvodu se staly isoflavonoidy předmětem našeho zájmu.

Inhibiční potenciál genisteinu a daidzeinu byl popsán ve farmakologicky dosažitelných koncentracích, tedy takových, které jsou dosažitelné ze stravy nebo po podání potravních doplňků (Nakashima et al. 1991, Guerrero et al. 2005, Karlickova et al. 2016). Na kaskádě kyseliny arachidonové naše skupina prokázala antiagregační potenciál genisteinu i daidzeinu, kdy obě tyto látky blokují destičkovou COX-1 a také jsou antagonisty na tromboxanových A_2 receptorech (Karlickova et al. 2016). Genistein byl i nejsilnějším inhibitorem COX-1 na mikrozomální suspenzi tohoto enzymu, v porovnání s biochaninem A, genistinem, formononetinem a daidzeinem. Překvapivě zde byl daidzein slabším inhibitorem, nicméně s IC_{50} stále nižším než pro ASA (Wang et al. 2000). Glykosidy daidzeinu i genisteinu byly na agregaci neúčinné (Karlickova et al. 2016).

Velice zajímavým isoflavonoidem se jeví tektorigenin. Jeho antiagregační účinky byly popsány na destičkách králíků, kde byl tektorigenin schopný inhibovat agregaci navozenou AA v koncentraci 100 µM a u koncentrace 20 µM zůstávala tato inhibice na zhruba 20 % (Lo et al. 2003). Existuje ještě jedna studie testující účinek tektorigeninu a jeho glykosidu tektoridinu na ovčí COX-1. Při koncentracích 3-30 µM byly obě neúčinné

(Kim et al. 1999), nicméně při koncentraci 100 µM tektorigenin vykazoval určitý, i když slabší, účinek než indometacin (You et al. 1999). Antiagregační účinky nejen tektorigeninu a tektoridinu byly naší skupinou testovány a jsou částí obsahu této dizertační práce.

Metabolity isoflavonoidů

Jak již bylo napsáno, metabolity isoflavonoidů jsou poměrně specifické, nicméně o jejich antiagregačních vlastnostech není doposud mnoho informací. Nejrozsáhlejší testování bylo provedeno naší skupinou a je také předmětem této dizertační práce.

Z literatury již bylo známo, že hlavním mechanismem antiagregačního účinku *S*- a *R,S*-equolu v plasmě obohacené o destičky byl antagonismus na tromboxanových A_2 receptorech (Munoz et al. 2009), který byl prokázán i v naší studii v plné krvi (Applova et al. 2017). Navíc se zdá, že by *S*-equol mohl i snižovat KVS riziko (Frankenfeld 2017). Také nebyl popsán žádný nebo velice malý rozdíl mezi účinky *S*-equolu, který je produkován přirozeně v tlustém střevě (Setchell et al. 2010b), a jeho racemickou směsí *R,S*-equolem (Munoz et al. 2009). Bohužel ne všichni lidé jsou schopní *S*-equol a také O-DMA produkovat metabolismem přijímaných isoflavonoidů s ohledem na složení střevní mikroflóry (Setchell et al. 2010, Frankenfeld 2011, Matthies et al. 2012).

Antiagregační vlastnosti 4-ethylfenolu byly předešlými studiemi sice zdokumentovány ale byly pozorovány ve vysokých koncentracích (v řádech mM) a vysvětleny jako nespecifický vliv na fluiditu (tekutost) destičkové membrány (Kitagawa et al. 1990, Tsuchiya 2001).

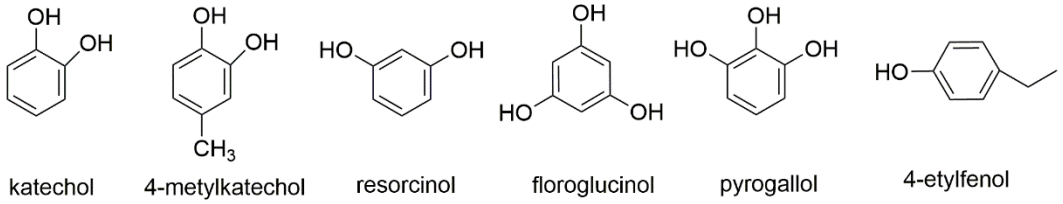
Fenolické kyseliny a metabolity

Existuje pouze několik studií, ve kterých byl testován antiagregační potenciál fenolických kyselin a metabolitů v podmínkách plasmy obohacené o destičky (Kim et al. 1998, Ostertag et al. 2011, Chang et al. 2012). I proto se tyto metabolity staly předmětem našeho výzkumu a v současné době je dokument, věnující se této problematice v recenzním řízení (příloha č. 1). Nejrozsáhlejší studie testovala antiagregační potenciál u 26 nízkomolekulárních fenolických sloučenin, které se běžně vyskytují v lidské potravě. Jednalo se o kyselinu benzoovou a její deriváty (např. kyseliny gallová a protokatechová), skořicové kyseliny (kyseliny p-kumarová, m-kumarová, kávová, sinapová, ferulová a hippurová) a malé hydroxybenzeny (pyrogallol, katechol a

resorcinol). Ze všech těchto testovaných látek byly pouze 4 schopné v koncentraci 100 µM inhibovat agregaci navozenou kolagenem (kyselina hippurová 8.9 ± 2.2 %, pyrogallol 8.9 ± 2.1 %, katechol 73.2 9 ± 2.0 % a resorcinol 30.5 ± 2.0 %). Ovlivnění agregace pod 50 µM bylo již nesignifikantní a pouze katechol byl schopný inhibovat agregaci navozenou trombinem (Ostertag et al. 2011). Katechol se běžně vyskytuje v ovoci a zelenině, ale také je to prokázaný metabolit flavanolů zeleného čaje (Crozier et al. 2010).

Jiná studie testovala účinky hydroxyskořicových kyselin (*p*-kumarová, kávová, ferulová a sinapová). Jejich antiagregační potenciál byl popsán, ale až při vysokých, farmakologicky nedosažitelných koncentracích mezi 478 a 816 µM (Hubbard et al. 2003). Kyselina gallová v následné studii inhibovala agregaci navozenou trombinem o 10-50 % při koncentracích od 10-50 µM (Lill et al. 2003). Překvapivě ale v jiné práci byla kyselina *p*-kumarová schopná výrazně snížit agregaci navozenou ADP a také snížit vyplavení tromboxanu po p.o. podání u králíků, nicméně její účinek na lidské destičky byl opět pozorován až při koncentraci ≥ 500 µM (Luceri et al. 2007, Pei et al. 2016). Tyto poznatky vypovídají o komplexnějším mechanismu účinku.

Zajímavý je také účinek floroglucinolu na králičí trombocyty. Ten v závislosti na dávce inhiboval agregaci navozenou AA při koncentrací 1-25 µM (Chang et al. 2012).



Obrázek č. 8. *Hydroxybenzeny.*

3 CÍL PRÁCE

Cílem dizertační práce bylo provést testování antiagregačních vlastností polyfenolických látek a jejich metabolitů v různých podmínkách a také se pokusit najít mechanismus tohoto působení u aktivních látek. Vhledem k rozsáhlosti tématu bylo zvoleno několik dílčích cílů:

- Provést rešerši literatury vztahující se k antiagregačním vlastnostem flavonoidů a polyfenolických látek.
- U vybraných skupin flavonoidů, které se budou zdát jako nejvhodnější pro testování podle předchozích výsledků dostupných z odborných zdrojů, provést screening protidestičkových účinků.
- Provést rešerši dat vztahující se k metabolismu flavonoidů.
- Relevantní a dostupné metabolity otestovat na antiagregační účinky.
- Zjistit mechanismus jejich antiagregačního působení u nejaktivnějších z nich.
- Potvrzení účinnosti na „*in vivo*-like“ modelu.

4 RECENTOVANÉ ODBORNÉ PUBLIKACE S IMPAKT FAKTOREM, KTERÉ SE VZTAHUJÍ K TÉMATU DIZERTAČNÍ PRÁCE

4.1 The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid

APPLOVÁ L., KARLÍČKOVÁ J., ŘÍHA M., FILIPSKÝ T., MACÁKOVÁ K., SPILKOVÁ J., MLADĚNKA P., The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid. Phytomedicine, 2017, *35*, 11-17.

/IF_{2016}=3.5/

Publikace je dostupná v plném znění v tištěné formě disertační práce anebo online https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711317301113.

4.2 9-(4´-dimethylaminophenyl)-2,6,7-trihydroxy-xantene-3-one is a potential novel antiplatelet drug which antagonizes the effect of thromboxane A_2

APPLOVÁ L., VELJOVIC E., MURATOVIC S., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., ZAVRŠNIK D., SASO L., DURIC K., HRDINA R., MLADĚNKA P. 9-(4'-dimethylaminophenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-one is a potentially novel antiplatelet drug antagonizing the effect of thromboxane A_2, Med Chem 14(2): 200-209.

/IF_{2016}=2.3/

Publikace je dostupná v plném znění v tištěné formě disertační práce anebo online http://www.eurekaselect.com/156307/article.

4.3 The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper

MIGKOS T.*, APPLOVÁ L.*, HORKÝ P., TVRDÝ V., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., HRUBSA M., CATAPANO M. C., TOMANEK M., POUR M., MLADĚNKA P. The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper. Phytomedicine **62**: 152974. *In press*

* these authors contributed equally to the study

/IF_{2017}=3.6/

Publikace je dostupná v plném znění v tištěné formě disertační práce anebo online https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711319301400?via%3Dihub.

4.4 Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo

POUROVÁ J., NAJMANOVÁ I., VOPRŠÁLOVÁ M., MIGKOS T., PILAŘOVÁ V., APPLOVÁ L., NOVÁKOVÁ L., MLADĚNKA P., Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo. Vascul Pharmacol 111: 36-43.

/IF_{2017}=3.6/

Publikace je dostupná v plném znění v tištěné formě disertační práce anebo online https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1537189118301241?via%3Dihub.

5 KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝCH PRACEM

Disertační práce je předkládána jako soubor čtyř prací, které souvisí s tématem dizertační práce, a které byly publikovány v recenzovaných impaktovaných časopisech.

Předkládané publikace věnované testování antiagregační aktivity navazují na předchozí studie, které byly provedené skupinou Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie a společně vytvářejí komplexnější pohled na antiagregační problematiku polyfenolických látek.

Nejprve byla provedena důkladná rešerše dostupných literárních zdrojů věnovaná polyfenolickým látkám a následně i jejich metabolitům, které vznikají v lidském gastrointestinálním traktu. Toto shrnutí bylo částečně publikováno ve článku 4.4. Z hlediska farmakodynamiky byl následně hodnocen jejich předpokládaný antiagregační potenciál za účelem potvrzení tohoto předpokladu.

Vlastní experimentální práce byly od předešlých studií rozšířeny a částečně modifikovány. Především se jednalo o měření antiagregačního potenciálu již v plné lidské krvi s využitím agregometru Multiplate® (Roche, Švýcarsko). Předcházející experimenty byly prováděny v plasmě obohacené o destičky (PRP) klasickou turbidimetrickou metodou na agregometru Chrono-log 500-Ca (Chrono-Log Co., USA). Tato metodika je sice považována za standard, ale má i svá omezení: 1) centrifugace plné krve za účelem získání PRP je spojená s rizikem předčasné aktivace destiček a vzniku agregátů, 2) plná krev je fyziologičtějším prostředím, které zvyšuje relevanci naměřených dat. Další výhodou tohoto nového agregometru je i menší objem vzorku testované krve a možnost paralelního měření až pěti vzorků, které výrazně urychluje zpracování odebraného biologického materiálu a tudíž i zlepšuje porovnatelnost a relevanci naměřených dat. Tímto způsobem bylo také možné rozšířit počet testovaných látek a zvýšit počet měření, a tím zpřesnit stanovení IC_{50} u účinných látek. Tato metodika také umožňuje relativně rychlou standardizaci agregačních experimentů. Lze takto vyzkoušet a porovnat i agregaci navozenou vápenatým ionoforem, ADP a trombinem, respektive jeho analogem bez prokoagulačních účinků. Při hledání mechanismu účinku byla většinou v cílovém kroku stanovena hladina sledovaného produktu (např. serotoninu a tromboxanu) metodikou ELISA, která umožňuje měření i velmi nízkých koncentrací.

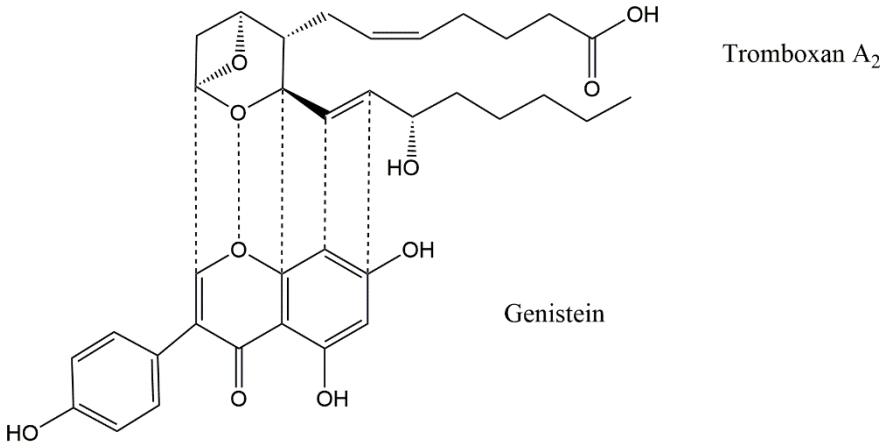
Z vědeckého pohledu je vhodné zmínit, že hlavním cílem celé práce nebylo ani tak nalézt nové léčivo s výjimkou práce 4.2, či doplnit informace o používaných léčivech, jak bývá běžné u farmakologických prací, ale zjistit, jestli existuje nějaký vztah mezi příjmem

polyfenolických látek, zejména flavonoidů, a antiagregačním účinkem. Je totiž dobře známo, že velkou součástí každodenního příjmu potravy jsou právě látky polyfenolické povahy. Jejich příjem nemusí být omezen pouze na složky potravy a tekutin, ale jsou přijímány jako nejrůznější doplňky stravy, jejichž příjem se neustále zvyšuje i s trendem zdravého životního stylu. Bohužel není nutné dodávat, že Česká republika patří k zemím s nejnižším příjmem flavonoidů v Evropě (Vogiatzoglou et al. 2014), a také je dobře známo, že přes výrazné pokroky v léčbě KVS onemocnění, zůstáváme v úmrtnosti na tyto choroby za většinou zemí západní Evropy (Roger et al. 2012).

Skupina kardiovaskulární a respirační farmakologie se již v předchozích letech věnovala antiagregačnímu působení rozličných polyfenolických látek. Jednalo se o vybrané deriváty kumarinů a nejvýznamnější zástupce flavonů, flavonolů, flavanolů, flavanonů a isoflavonoidů (Macakova et al. 2012, Karlickova et al. 2016). U naposledy zmíněné skupiny byla pozorována vyšší antiagregační aktivita, a proto byla isoflavonoidům věnována samostatná publikace, zahrnující 16 komerčně dostupných isoflavonoidů a jejich 2 metabolity – publikace 4.1.

Pro testování isoflavonoidů jsme se rozhodli i proto, že z epidemiologických dat vyplývá, že asijské země s vysokým příjmem sójových produktů mají nižší výskyt KVS chorob: např. Kokubo et al. 2007 uvádí snížené riziko akutního koronárního syndromu u japonských žen. Pro tento poznatek může být velké množství důvodů, nicméně jejich potrava bohatá na isoflavonoidy může být jedním z možných vysvětlení (Gottstein et al. 2003, Sagara et al. 2004, Jian 2009). Isoflavonoidy mají řadu pozitivních vlastností a jejich antiagregační potenciál může přispívat k jejich výslednému příznivému účinku, nicméně dosavadní studie se věnovaly především genisteinu a daidzeinu (Wang et al. 2000, Gottstein et al. 2003, Guerrero et al. 2005, Guerrero et al. 2007, Bojic et al. 2011, Karlickova et al. 2016). Naše výsledky nejen, že potvrdily účinek daidzeinu a genisteinu z minulých našich i jiných studií, ale poukázaly, že tento účinek je přítomen i v plné lidské krvi. Jejich mechanismus účinku byl již předešlými studiemi stanoven antagonismus na tromboxanových receptorech (Navarro-Nunez et al. 2009). Kromě tohoto účinku se ale také ukázalo, že některé isoflavonoidy mají dvojí účinek. Inhibují totiž i destičkovou COX-1, a to dokonce v jednotkách μM (Karlickova et al. 2016). Nedosahují sice účinku ASA a jejich účinek nedosahuje ani plné inhibice v biologicky relevantních koncentracích, ale je třeba si uvědomit, že nejde o registrovaná léčiva ale složky potravy. Tento nález tedy může mít fyziologický význam. Je zajímavé, že inhibice samotné COX-1 byla nalezena i u jiných isoflavonoidů, především u tektorigeninu, nicméně tento účinek

nebyl potvrzen ve fyziologických podmínkách PRP. I přesto, že tektorigenin v reálných podmínkách asi nebude inhibovat tento enzym významně, byla tato látka velmi účinná v inhibici agregace navozené AA. Naměřené hodnoty IC_{50} byly přibližně 3x nižší než u ASA. Hlavním mechanismem účinku byl stanoven antagonismus na tromboxanových receptorech a to i v koncentracích, u kterých se dá předpokládat, že odpovídají nalezenému vysokému potenciálu blokovat agregaci destiček navozenou AA. Již dříve bylo navrženo, že antagonismus na tromboxanových receptorech spočívá ve strukturní podobnosti (iso)flavonoidů s tromboxanem (obr. č. 10) (Guerrero et al. 2007, Navarro-Nunez et al. 2009).



Obrázek č. 9. *Strukturní podobnost tromboxanu A_2 a genisteinu.*

Upraveno podle Navarro-Nunez et al. 2009.

Druhým dílčím cílem isoflavonoidní studie bylo stanovení vztahu struktura-účinek. Isoflavonoidy byly na základě svých antiagregačních vlastností na agregaci navozenou AA rozděleny do 4 skupin, které zároveň odráží i jejich strukturu (kapitola 4.1. Table 1). Wang et al. 2000 usoudili, že 7,4´-dihydroxy skupina představuje nejdůležitější funkční skupinu, což bylo naší studií skutečně potvrzeno. Tato základní struktura bez dalších substitucí je prezentována daidzeinem. Náhradou jedné nebo více hydroxylových skupin metoxylovými vede ke snížení antiagregačního účinku (biochanin A, kalykosin, kladrin, formononetin, isoformononetin, 4´,6,7-trihydroxyflavon), zatímco substituce glukózou v pozici C7 je spojena s úplnou ztrátou účinku (daidzin, genistin, glycitin, ononin). Tento poznatek byl potvrzen i další studií a popsán i pro flavonoidy (Wang et al. 2000, Navarro-Nunez et al. 2009). Přítomnost hydroxylové skupiny v poloze C5 se zdá být přínosná

(genistein) a společně s metoxy skupinou v poloze C6 výrazně zvyšuje antiagregační potenciál (tektorigenin). Mezi účinné isoflavonoidy patří i jiné metoxylované deriváty, např. 5,7-dihydroxy-6,4´-dimetoxyisoflavon (irisolidon), jehož antiagregační účinek byl na promytých potkaních destičkách vyšší než u ASA (Kim and Yun-Choi 2008). Naopak iristektorigenin, který se liší od tektorigeninu pouze substitucí 3´-hydroxy-4´-metoxy skupiny na kruhu B byl neúčinný na lidskou COX-1 (You et al. 1999).

Ve studii 4.1 byl také zahrnut *S*-equol, jako jeden z mikrobiálních metabolitů isoflavonoidů, a i tato látka vykázala schopnost inhibovat agregaci krevních destiček. Z tohoto důvodu byly zařazeny do další studie i jiné mikrobiální metabolity isoflavonoidů. Obecně jsou metabolity, které vznikají metabolismem isoflavonoidů v GIT odlišné od ostatních metabolitů flavonoidů. *S*-equol vzniká jako produkt metabolismu řady isoflavonoidů: daidzeinu, daidzinu, formononetinu a puerarinu (obr. č. 8).

Mikroflórou produkovaný *S*-equol i komerčně lépe dostupný racemát *R,S*-equol byly schopny inhibovat agregaci navozenou AA (Applova et al. 2017) a nově i kolagenem v plné krvi, kde jejich antiagregační účinek byl srovnatelný s ASA. Nezdá se, že by *S* a *R,S*-equol ovlivňovaly rovnováhu vápníku nebo jiné agregační kaskády. Jako hlavní mechanismus účinku byl opět stanoven antagonismus na tromboxanových receptorech (Munoz et al. 2009, Applova et al. 2017). Tento nález není až tak překvapivý, protože tyto metabolity mají zachovalé flavonoidní jádro a jsou tedy jako některé (iso)flavonoidy strukturálně blízké tromboxanu A_2 (obr. č. 10). Předešlé studie prokázaly tento účinek pouze na promytých destičkách nebo PRP, tato studie rozšířila poznatky o testování v plné krvi. Navíc byl v plné krvi dokonce pozorován ještě vyšší antiagregační potenciál než u isolovaných destiček nebo v PRP. Tato data by mohla podporovat předpoklad, že *S*-equol snižuje KVS riziko (Frankenfeld 2017). Na druhé straně je nutné podotknout, že ne všichni lidé jsou schopní *S*-equol produkovat s ohledem na složení jejich GIT mikroflóry (Setchell and Clerici 2010, Frankenfeld 2011, Matthies et al. 2012). I proto byly do studie zahrnuty další isoflavonoidní metabolity. Z nich vykazovaly antiagregační potenciál 4-ethylfenol a O-DMA, u které Frankenfeld 2011 v návaznosti na zanalyzování dostupných klinických dat předpokládá pozitivní vliv na lidské zdraví. Antiagregační potenciál (2RS)-2-(4-hydroxyfenyl)propionové kyseliny nebyl doposud testován, nicméně naše data poukazují na zanedbatelný účinek. Naopak protidestičkový účinek 4-etylfenolu byl již zdokumentován a popsán jako nespecifický vliv na fluiditu membrán (Kitagawa et al. 1990, Tsuchiya 2001). Tady je ale nutné zmínit, že dané studie testovaly vysoké koncentrace, hodnota IC_{50} byla u 4-etylfenolu 1.4 ± 0.2 mM (Kitagawa et al. 1990). V naší

studii dosahoval 4-etylfenol IC_{50} 63.9 ± 1.1 µM u AA a 59.8 ± 5.9 µM u kolagenem navozené agregace. Dále byl prokázán účinek proti destičkové COX-1 a tromboxan syntáze a ovlivnění rovnováhy vápníku, ale pouze částečný vliv na tromboxanové receptory, který může být dán právě ovlivněním Ca^{2+}. Mechanismus účinku se proto zdá být multifaktoriální. Účinek O-DMA byl o něco nižší, tato látka také inhibovala tromboxan syntázu, částečně ovlivnila Ca^{2+} homeostázu a tromboxanové receptory.

Zajímavý je účinek *S*-equolu a 4-etylfenolu na agregaci navozenou kolagenem, kde obě látky dosáhly prakticky stejného účinku jako ASA, ačkoliv jejich účinek byl nižší při navození agregace AA. Porovnávání účinku s ASA, jak již bylo uvedeno výše, je svým způsobem nevhodné, jelikož ASA se používá při jasných KVS indikacích, zatímco isoflavonoidy jsou součástí stravy. Z tohoto důvodu se dá říci, že slabší antiagregační účinek isoflavonoidů a jejich metabolitů může být spíše pozitivní. Jelikož se u některých jedinců tvoří všechny tyto metabolity a navíc se vstřebávají částečně i parentní látky (genistein, daidzein), je docela pravděpodobné, že všechny tyto látky mohou přispívat ke konečnému účinku podávaných isoflavonoidů. Ze získaných dat a dostupné literatury samozřejmě nelze definovat, zda tyto účinky jsou hlavním faktorem či pouze přispívají k příznivému vlivu na KVS systém u konzumentů sóji. V každém případě se dále plánuje analyzovat tyto metabolity v lidské krvi a zjistit tak jejich reálnou expozici v populaci. Tyto výsledky jsou zatím známy prakticky jen pro nejvíce testovaný *S*-equol (Setchell et al. 2001, Vergne et al. 2007, van der Velpen et al. 2014).

Studie, kterou jsme provedli na metabolitech isoflavonoidů nás utvrdila ve správném směru, kterým bychom se měli při testování vydat. Byla provedena důkladná analýza nejdůležitějších a nejčetnějších flavonoidních metabolitů, které vznikají v lidském těle. Následně byla vytvořena skupina 29 dostupných derivátů kyseliny propionové, benzoové, octové a malých hydroxybenzenů. Tato studie je aktuálně v recenzním řízení a její kopie je součástí této práce jako příloha.

Prvotní testování bylo výrazně selektivní, jelikož pouze 4 z těchto látek byly schopny inhibovat agregaci navozenou AA v plné krvi, a to ve vysoké, v plasmě po p.o. podání, nedosažitelné koncentraci 240 µM. Jednalo se o malé hydroxybenzeny, jmenovitě 4-metylkatechol (4-MC), floroglucinol, resorcinol a pyrogallol. Antiagregační potenciál některých malých fenolických látek, které tvoří součást lidské potravy, byl již zdokumentován studií Ostertag et al. 2011, a to konkrétně u kyseliny hippurové, resorcinolu, pyrogallolu a katecholu na kolagen navozenou agregaci v lidské PRP. Tyto látky byly schopné inhibovat agregaci destiček při koncentraci 100 µM (kyselina

hippurová 8.9 ± 2.2 %, pyrogallol 8.9 ± 2.1 %, katechol 73.2 9 ± 2.0 % a resorcinol 30.5 ± 2.0 %). Ovlivnění agregace pod 50 µM bylo již nesignifikantní a pouze katechol byl schopný inhibovat agregaci navozenou trombinem (Ostertag et al. 2011). V naší studii byl účinek resorcinolu v koncentraci 100 µM prakticky nulový, ale pyrogallol vykazoval slabý účinek dokonce v koncentraci 10 µM. Pozorovaný účinek floroglucinolu na AA indukovanou agregaci byl slabší, ale aktivita u kolagenem navozené agregace byla popsána stejná jako u studie Chang et al. 2012.

Pokud víme, neexistují žádné studie zabývající se antiagregačním účinkem 4-MC. Jak již bylo popsáno výše, existují ale tato data pro katechol. Tyto dvě látky se od sebe liší pouze absencí jedné metoxy skupiny. Jejich porovnatelné výsledky dokazují, že zmíněná metoxy skupina není pravděpodobně nezbytně nutná pro antiagregační účinek, ale hydroxylové skupiny v poloze 1 a 2 jsou esenciální. Jelikož účinek katecholu na rozdíl od 4-MC velice rychle vymizí v nižších koncentracích (Ostertag et al. 2011), dá se předpokládat, že metoxy skupina zvyšuje stabilitu látky či její účinnost. 4-MC se nachází v některých rostlinách, například v druzích rodu *Ferula* (Erat et al. 2006), ale především se jedná o lidský intestinální metabolit kvercetinu (Schneider et al. 1999a). Kvercetin nemusí být nikterak detailněji popisován, jedná se totiž o nejrozšířenější flavonol, který bývá spojován s řadou pozitivních účinků na lidské zdraví, zahrnující z KVS pohledu účinek antihypertenzní (Chirumbolo 2012) i antiagregační (Hubbard et al. 2003, Guerrero et al. 2007). Nicméně kvercetin v plasmě dosahuje pouze velmi nízkých koncentrací (Hubbard et al. 2003) a je především přítomen ve formě rozličných konjugátů (Del Rio et al. 2013). Potenciál 4-MC a dalších metabolitů kvercetinu snižovat krevní tlak byl již naší skupinou úspěšně popsán (Najmanova et al. 2016, Pourova et al. 2018).

Dalším lidským GIT metabolitem kvercetinu (Schneider et al. 1999b) a navíc i naringinu, hesperidinu, poncirinu a katechinu (Kim et al. 1998) je floroglucinol. Ten byl také izolován z některých rostlinných druhů, například hnědých řas *Ecklonia cava*, které jsou aktuálně moderním doplňkem stravy. Byly u něj prokázány účinky protizánětlivé i antioxidační (Chang et al. 2012) a také se objevila studie o možném protektivním účinku floroglucinolu na ischemicko-reperfúzní poškození srdce (Li et al. 2011). Floroglucinol nebyl schopný antagonizovat tromboxanové receptory, ale byl schopný inhibovat COX-1 v koncentracích 10 µM, 25 µM a 50 µM o 45%, 64% a 74% (Chang et al. 2012). Naše data při stejných koncentracích vykazovala hodnoty 11 ± 1 %, 35 ± 2% a 61 ±

6%. Rozdíly budou asi dány použitím plné krve, která je fyziologičtějším prostředím, a tyto výsledky by tak měly být z klinického hlediska relevantnější.

Dalším významným metabolitem (-) epigallokatechin gallátu, baikaleinu, či delphidinu je pyrogallol (Kim et al. 1998, Schneider et al. 1999b, Crozier et al. 2010). Ten můžeme nalézt ve vysoké koncentraci ve stévii (*Stevia rebaudiana)*, která je aktuálně hojně využívaná jako umělé sladidlo a obsah pyrogallolu je zde nejvyšší ze všech polyfenolů (téměř 1 g ve 100 g rostliny) (Kim et al. 2011). Přítomnost pyrogallolu společně s kvercetinem by mohla být také zodpovědná za pozorovaný antihypertenzní účinek stévie (De et al. 2013).

Pozorovaný antiagregační účinek 4-MC na agregaci navozenou AA a kolagenem byl zhruba 10x vyšší než u ASA. Koncentrace ASA u citlivých jedinců kolísá v rozmezí 2.9 – 33.3 µM po požití jednorázové dávky 460 mg (Dahlen et al. 1994). V našich studiích tyto koncentrace vedly k maximální destičkové inhibici přibližně 50% u AA (27.5 ± 1.3 µM je námi stanovená hodnota IC_{50}) a 40% u kolagenem navozené agregace. Pozorovaný antiagregační účinek 4-MC byl v tomto rozmezí koncentrací přibližně 40-77% u AA a zhruba 16-59% u kolagenem navozené agregace. Je vhodné zmínit, že pozorované koncentrace sulfátů pyrogallolu a katecholu po podání potravní směsi polyfenolických látek byly v rozmezí 5-20 µM (Pimpao et al. 2015, Feliciano et al. 2016). Dokonce i v tomto koncentračním rozmezí byl 4-MC schopen signifikantně inhibovat agregaci navozenou AA i kolagenem. Během hledání mechanismu účinku bylo zjištěno, že 4-MC nebyl schopný inhibovat COX-1 ani antagonizovat receptory pro tromboxan, nicméně blokoval tromboxan syntázu. Tato inhibice nebude ale jeho hlavní mechanismus účinku s ohledem na použité koncentrace a sílu inhibice. Následné testy směřovaly ke zjištění, zda nemůže být ovlivněna kinetika vznikajícího tromboxanu, ale i tento mechanismus byl vyloučen. Jelikož aktivace trombocytů AA i kolagenem vede ke zvýšení intracelulárního vápníku (Hsiao et al. 1998), byl 4-MC otestován i na možné ovlivnění metabolismu vápenatých iontů. Přímá chelatace iontů vápníku byla vyloučena, ale na základě dalších výsledků předpokládáme, že hlavním mechanismem účinku bude ovlivnění transportu těchto iontů.

Pozitivní účinek 4-MC a pyrogallolu byl později potvrzen na novém *ex ovo* (anti)trombotickém modelu, který napodobuje *in vivo* podmínky. Tento vaječný model se běžně používá pro studium toxicity látek a pro tento typ testování byl přizpůsoben a standardizován. Na rozdíl od klasického HET-CAV (*Ex ovo* hen's egg test on chick area vasculosa) modelu (Luepke 1985) byla použita dřívější stadia vývoje, abychom se vyhnuli

nespecifickým reakcím imunitního a nervového systému (Rosenbruch 1994). Krev vyvíjecích se embryí již obsahuje trombocyty (Tahara et al. 1983) a jejich aktivace probíhala lokální aplikací AA. Stejný způsob aplikace kolagenu ale nevedl k agregaci destiček. Předpokládáme, že molekula kolagenu má natolik velkou molekulovou hmotnost, že není schopná proniknout přes vaječnou membránu. Oproti tomu AA dosahovala maxima účinku po pouhých 10 minutách od aplikace. Bez premedikace navodila AA letalitu u 46 % vzorků během první hodiny a u 60 % během 24 hodin. Premedikace ASA snížila úmrtnost na 7 % po první hodině a 27 % po 24 hodinách. Tyto výsledky potvrdily aplikovatelnost modelu pro testování antiagregačních látek. Následná aplikace 4-MC ukázala velmi vysoký protektivní účinek: bez mortality v první hodině a pouze 7 % úmrtností po 24 hodinách. Tato data byla srovnatelná s negativní kontrolou. Stejný vliv byl pozorován po první hodině i u pyrogallolu, nicméně po 24 hodinách byla úmrtnost porovnatelná s ASA (31 %). Systémová premedikace tedy potvrdila naše antiagregační výsledky získané na lidské krvi.

Souhrnně lze říci, že tyto publikované práce s polyfenoly tvořícími součást naší potravy a jejich metabolity naznačují možné protektivní účinky na KVS systém. Nicméně u nejaktivnějších látek je stále prostor k získání nových informací, především jejich farmakokinetiky a tedy ověření biologické relevance, a posléze, vzhledem k odlišnému mechanismu účinku, zjištění možné potenciace účinku klinicky používaných antiagregačních látek těmito metabolity.

Součástí této dizertační práce bylo i otestování antiagregačních účinků nově nasyntetizovaných látek ze skupiny derivátů xanten-3-onů (publikace č. 4.2). Jejich antiagregační účinky byly překvapením, tyto látky byly naší skupinou primárně testovány jako potenciální nové chelátory kovů.

Z 12 testovaných látek na AA navozenou agregaci byly vybrány dvě nejaktivnější, které byly dále zkoumány. 9-(2´-hydroxy-5´-bromofenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanten-3-on byl nejúčinnější látkou na AA navozenou agregaci a také vykazoval inhibici COX-1. Tato inhibice ale nebyla potvrzena v PRP. Druhou nejúčinnější látkou u AA indukované agregace byla stanovena 9-(4´-dimetylamino-fenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanten-3-on, která byla naopak nejvíce aktivní na kolagenem navozenou agregaci, a to dokonce ve srovnatelných koncentracích jako ASA. Její mechanismus účinku byl následně stanoven jako antagonismus na tromboxanových receptorech. U této látky je nasnadě provést další rozšířené testování a následně se zaměřit i na její strukturní obměny, které by mohly vést k dalším antiagregačním látkám této skupiny.

6 PODÍL KANDIDÁTA NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH

4.1 The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid

- provedení většiny experimentů
- zpracování a analýza dat
- příprava rukopisu

4.2 9-(4´-dimethylaminophenyl)-2,6,7-trihydroxy-xantene-3-one is a potential novel antiplatelet drug which antagonizes the effect of thromboxane A_2

- provedení podstatné části experimentů
- zpracování a analýza dat
- příprava rukopisu

4.3 The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper

- provedení podstatné části antiagregačních experimentů
- zpracování a analýza antiagregačních dat
- příprava části rukopisu

4.4 Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo

- rešerše literatury týkající se fenolických metabolitů

7 SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1. *Soupis nejvýznamnějších látek obsažených v destičkových granulích.*.....8

Tabulka č. 2. *Agregačně významné receptory a jejich ligandy.* 9

Tabulka č. 3. *Možné mechanismy účinku aspirinové a klopidogrelové rezistence.* 18

8 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1. *Zjednodušená struktura trombocytu.* 3

Obrázek č. 2. *Schematické znázornění metabolismu kyseliny arachidonové vedoucí k různým prostaglandinům.* 5

Obrázek č. 3. *Schématické znázornění aktivace trombocytu.* 13

Obrázek č. 4. *Koagulační kaskáda.* 14

Obrázek č. 5*. Struktura kumarinů.* 21

Obrázek č. 6. *Základní struktury flavonoidních sloučenin.* 24

Obrázek č. 7. *Stilbeny a lignany.* 25

Obrázek č. 8. *Zjednodušené schéma metabolické cesty vybraných isoflavonoidů v GIT.* . 29

Obrázek č. 9. *Hydroxybenzeny.* 33

Obrázek č. 10. *Strukturní podobnost tromboxanu A_2 a genisteinu.* 41

9 SEZNAM ZKRATEK

4-MC	4-metylkatechol (z angl. 4-methylcatechol)
AA	kyselina arachidonová (z angl. arachidonic acid)
ASA	acetylsalicylová kyselina (z angl. acetylsalicylic acid)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
COX-1	cyklooxygenáza-1
DM	diabetes mellitus
DTS	denzní tubulární systém (z angl. dense tubular system)
GIT	gastrointestinální trakt
IPP	inhibitory protonové pumpy
KVS	kardiovaskulární např. onemocnění
O-DMA	O-desmetylangolensin
PAF	destičky aktivující faktor (z angl. platelets activating factor)
PRP	plasma obohacená o destičky (z angl. platelet rich plasma)
TXA_2	tromboxan A_2

10 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH ODBORNÝCH PRACÍ

10.1 Recenzované publikace v časopisech s impakt faktorem

APPLOVÁ L., KARLÍČKOVÁ J., ŘÍHA M., FILIPSKÝ T., MACÁKOVÁ K., SPILKOVÁ J., MLADĚNKA P., The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid. Phytomedicine, 2017, *35*, 11-17.

/IF_{2016}=3.5/

APPLOVÁ L., VELJOVIC E., MURATOVIC S., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., ZAVRŠNIK D., SASO L., DURIC K., HRDINA R., MLADĚNKA P. 9-(4'-dimethylaminophenyl)-2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-one is a potentially novel antiplatelet drug antagonizing the effect of thromboxane A_2, Med Chem 14(2): 200-209.

/IF_{2016}=2.3/

MLADĚNKA P., APPLOVÁ L., PATOČKA J., COSTA VM., REMIAO F., POUROVÁ J., MLADĚNKA A., KARLÍČKOVÁ J., JAHODÁŘ L., VOPRŠÁLOVÁ M., VARNER KJ., ŠTĚRBA M.,TOX-OER AND CARDIOTOX Hradec Králové Researchers and Collaborators. Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents. Med Res Rev. 2018 Jul; 38(4): 1332–1403. Med Res Rev 38(4): 1332-1403.

/IF_{2017}=8.8/

NAVRÁTILOVÁ L., APPLOVÁ L., HORKÝ P., MLADĚNKA P., PÁVEK P., TREJTNAR F., Interaction of soy isoflavones and their main metabolites with hOATP2B1 transporter. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 391(10): 1063-1071.

/IF_{2017}=2.5/

POUROVÁ J., NAJMANOVÁ I., VOPRŠÁLOVÁ M., MIGKOS T., PILAŘOVÁ Ve., APPLOVÁ L., NOVÁKOVÁ L., MLADĚNKA P., Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo. Vascul Pharmacol 111: 36-43.

/IF_{2017}=3.6/

MIGKOS T.*, APPLOVÁ L.*, HORKÝ P., TVRDÝ V., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., HRUBSA M., CATAPANO M. C., TOMANEK M., POUR M., MLADĚNKA P. The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper. Phytomedicine **62**: 152974. *In press*

* tito autoři přispěli stejným dílem

/IF_{2017}=3.6/

10.2 Přednášky na konferencích

6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy

Hradec Králové, 9. - 10. 2. 2016

APPLOVÁ L., MLADĚNKA P., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., ŘÍHA M., FILIPSKÝ T., HRDINA R. Different substitution of isoflavonoids core influence markedly their antiplatelet potential. Kniha abstraktů 6. Postgraduální a 4. Postdoktorandské vědecké konference.

7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy

Hradec Králové, 7. - 8. 2. 2017

APPLOVÁ L., VELJOVIĆ E., MURATOVIĆ S., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., ZAVRŠNIK D., SASO L., DURIĆ K., HRDINA R., MLADĚNKA P. Antiplatelet potential of series of 9-phenyl-2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-ones derivatives. Kniha abstraktů 7. Postgraduální a 5. Postdoktorandské vědecké konference.

8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy

Hradec Králové, 24. - 25. 1. 2018

APPLOVÁ, L., KARLÍČKOVÁ, J., TVRDÝ, V., MLADĚNKA, P., The influence of flavonoids metabolites on platelet aggregation. Kniha abstraktů 8. Postgraduální a 6. Postdoktorandské vědecké konference.

9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy

Hradec Králové, 23. - 24. 1. 2019

APPLOVÁ, L., WARNCKE, P., KARLÍČKOVÁ, J., FISCHER, D., MLADĚNKA, P., The antiplatelet effect of 4-methylcatechol was confirmed on in vivo (ex evo) hen´s egg test on the chick area vasculosa. Kniha abstraktů 9. Postgraduální a 7. Postdoktorandské vědecké konference.

10.3 Posterové prezentace na konferencích

7 th International Conference on Polyfenols and Health

Tours, Francie, 27. - 30. 10. 2015

APPLOVÁ L., MLADĚNKA P., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., ŘÍHA M., FILIPSKÝ T., HRDINA R. Effect of isoflavonoids on platelet aggregation. Sborník abstraktů konference 2015: 225

66. Česko-Slovenské farmakologické dny

Brno, Česká republika, 13. - 15. 9. 2016

APPLOVÁ L., MLADĚNKA P., KARLÍČKOVÁ J, MACÁKOVÁ K., ŘÍHA M., FILIPSKÝ T. Antiplatelet potential of isoflavonoids. Sborník abstraktů konference, 2016: 10

European Congress on Thrombosis and Haemostasis

Haag, Nizozemí, 28. - 30. 9. 2016

APPLOVÁ L., MLADĚNKA P., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁK., ŘÍHA M., FILIPSKÝ T., HRDINA R. Evaluation of isoflavonoids antiplatelet potential in relation to their structural modifications, Sborník abstraktů konference 2016: 96

11th Polyphenols World Congress on Polyphenols Applications

Vídeň, Rakousko, 20.-21.6.2017

APPLOVÁ L., VELJOVIĆ E., MURATOVIĆ S., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., ZAVRŠNIK D., SASO L., DURIĆ K., HRDINA R., MLADĚNKA P. Antiplatelet effects of series of 9-phenyl-2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-ones derivatives. Sborník abstraktů konference 2017

67. Česko-Slovenské farmakologické dny

Stará Lesná, Slovensko, 2.-4.10.2017

APPLOVÁ L., VELJOVIĆ E., MURATOVIĆ S., KARLÍČKOVÁ J., MACÁKOVÁ K., ZAVRŠNIK D., SASO L., DURIĆ K., HRDINA R., MLADĚNKA P. Antiplatelet potential of series of 9-phenyl-2,6,7-trihydroxy-xanthene-3-ones derivatives, Sborník abstraktů konference 2017: 17

European Congress on Thrombosis and Haemostasis

Marseille, Francie, 24. - 26. 10. 2018

APPLOVÁ, L., KARLÍČKOVÁ, J., TVRDÝ, V., MACAKOVA K., MLADĚNKA, P., Flavonoid metabolites with antiplatelet effects. Sborník abstraktů konference 2018: 288

11 POUŽITÁ LITERATURA

Abdel-Shafy H. I., Mohamed-Mansour. M., S. (2017). Polyphenols: Properties, Occurrence, Content in Food, Potential Effects. Houston, TX 77072 - U.S.A, TUDIUM PRESS LLC, P.O. Box 722200.

Alvarez, A. I., R. Real, M. Perez, G. Mendoza, J. G. Prieto, G. Merino (2010). "Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response." J Pharm Sci **99**(2): 598-617.

Anfossi, G., I. Russo, M. Trovati (2008). "Resistance to aspirin and thienopyridines in diabetes mellitus and metabolic syndrome." Curr Vasc Pharmacol **6**(4): 313-328.

Antithrombotic Trialists, C. (2002). "Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients." BMJ **324**(7329): 71-86.

Applova, L., J. Karlickova, M. Riha, T. Filipsky, K. Macakova, J. Spilkova, P. Mladenka (2017). "The isoflavonoid tectorigenin has better antiplatelet potential than acetylsalicylic acid." Phytomedicine **35**: 11-17.

Bate-Smith, E. C. (1954). "Leuco-anthocyanins. 1. Detection and identification of anthocyanidins formed leuco-anthocyanins in plant tissues." Biochem J **58**(1): 122-125.

Bojic, M., Z. Debeljak, M. Tomicic, M. Medic-Saric, S. Tomic (2011). "Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series." Nutr J **10**: 73.

Borges, F., F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte (2005). "Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity." Curr Med Chem **12**(8): 887-916.

Boue, S. M., T. E. Wiese, S. Nehls, M. E. Burow, S. Elliott, C. H. Carter-Wientjes, B. Y. Shih, J. A. McLachlan, T. E. Cleveland (2003). "Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens." J Agric Food Chem **51**(8): 2193-2199.

Bouchard, B. A., P. B. Tracy (2001). "Platelets, leukocytes, and coagulation." Curr Opin Hematol **8**(5): 263-269.

Bravo, L. (1998). "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." Nutr Rev **56**(11): 317-333.

Bultas, J. K., D. (2017). "Enterosolventní forma kyseliny acetylsalicylové – ano, či ne?" Remedia **2**: 145-151.

Cattaneo, M., C. Gachet (2001). "The platelet ADP receptors." Haematologica **86**(4): 346-348.

Coccheri, S. (2007). "Approaches to prevention of cardiovascular complications and events in diabetes mellitus." Drugs **67**(7): 997-1026.

Coccheri, S. (2010). "Antiplatelet drugs--do we need new options? With a reappraisal of direct thromboxane inhibitors." Drugs **70**(7): 887-908.

Coldham, N. G., C. Darby, M. Hows, L. J. King, A. Q. Zhang, M. J. Sauer (2002). "Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism." Xenobiotica **32**(1): 45-62.

Cornwell, T., W. Cohick, I. Raskin (2004). "Dietary phytoestrogens and health." Phytochemistry **65**(8): 995-1016.

Crozier, A., D. Del Rio, M. N. Clifford (2010). "Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds." Mol Aspects Med **31**(6): 446-467.

D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, R. Masella (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." Ann Ist Super Sanita **43**(4): 348-361.

D'Archivio, M., C. Filesi, R. Vari, B. Scazzocchio, R. Masella (2010). "Bioavailability of the polyphenols: status and controversies." Int J Mol Sci **11**(4): 1321-1342.

Dahlen, B., L. O. Boreus, P. Anderson, R. Andersson, O. Zetterstrom (1994). "Plasma acetylsalicylic acid and salicylic acid levels during aspirin provocation in aspirin-sensitive subjects." Allergy **49**(1): 43-49.

Day, A. J., F. J. Canada, J. C. Diaz, P. A. Kroon, R. McLauchlan, C. B. Faulds, G. W. Plumb, M. R. Morgan, G. Williamson (2000). "Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase." FEBS Lett **468**(2-3): 166-170.

de Gaetano, G., P. Collaborative Group of the Primary Prevention (2001). "Low-dose aspirin and vitamin E in people at cardiovascular risk: a randomised trial in general practice. Collaborative Group of the Primary Prevention Project." Lancet **357**(9250): 89-95.

De, S., S. Mondal, S. Banerjee (2013). Stevioside: Technology, Applications and Health, Wiley-Blackwell.

Del Rio, D., A. Rodriguez-Mateos, J. P. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier (2013). "Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases." Antioxid Redox Signaling **18**(14): 1818-1892.

Derle, E., R. Ocal, S. Kibaroglu, C. Celikkol, N. Bayraktar, H. Verdi, B. F. Atac, U. Can (2016). "Aspirin resistance in cerebrovascular disease and the role of glycoprotein IIIa polymorphism in Turkish stroke patients." Blood Coagulation and Fibrinolysis **27**(2): 169-175.

Dorn, G. W., 2nd, N. Liel, J. L. Trask, D. E. Mais, M. E. Assey, P. V. Halushka (1990). "Increased platelet thromboxane A2/prostaglandin H2 receptors in patients with acute myocardial infarction." Circulation **81**(1): 212-218.

Eikelboom, J. W., J. Hirsh, J. I. Weitz, M. Johnston, Q. Yi, S. Yusuf (2002). "Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events." Circulation **105**(14): 1650-1655.

Elwood, P. C., S. Renaud, D. S. Sharp, A. D. Beswick, J. R. Obrien, J. W. G. Yarnell (1991). "Ischemic-Heart-Disease and Platelet-Aggregation - the Caerphilly Collaborative Heart-Disease Study." Circulation **83**(1): 38-44.

Erat, M., H. Sakiroglu, O. I. Kufrevioglu (2006). "Purification and characterization of polyphenol oxidase from Ferula sp." Food Chem **95**(3): 503-508.

Erlund, I. (2014). "Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology." Nutr Res **24**(10): 851-874.

Feliciano, R. P., A. Boeres, L. Massacessi, G. Istas, M. R. Ventura, C. Nunes Dos Santos, C. Heiss, A. Rodriguez-Mateos (2016). "Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols." Arch Biochem Biophys **599**: 31-41.

Ferrazzano, G. F., I. Amato, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Pinto, A. Pollio (2011). "Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review." Molecules **16**(2): 1486-1507.

Filipsky, T., M. Riha, K. Macakova, E. Anzenbacherova, J. Karlickova, P. Mladenka (2015). "Antioxidant effects of coumarins include direct radical scavenging, metal chelation and inhibition of ROS-producing enzymes." Curr Top Med Chem **15**(5): 415-431.

Fitzgerald, D. J. (2001). "Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion." Neurology **57**(5 Suppl 2): S1-4.

Fonseca, F. V., L. Baldissera, Jr., E. A. Camargo, E. Antunes, E. B. Diz-Filho, A. G. Correa, L. O. Beriam, D. O. Toyama, C. A. Cotrim, J. Alvin, Jr., M. H. Toyama (2010). "Effect of the synthetic coumarin, ethyl 2-oxo-

2H-chromene-3-carboxylate, on activity of Crotalus durissus ruruima sPLA2 as well as on edema and platelet aggregation induced by this factor." Toxicon **55**(8): 1527-1530.

Frankenfeld, C. L. (2011). "O-desmethylangolensin: the importance of equol's lesser known cousin to human health." Adv Nutr **2**(4): 317-324.

Frankenfeld, C. L. (2017). "Cardiometabolic risk and gut microbial phytoestrogen metabolite phenotypes." Mol Nutr Food Res **61**(1).

Fullard, J. F. (2004). "The role of the platelet glycoprotein IIb/IIIa in thrombosis and haemostasis." Curr Pharm Des **10**(14): 1567-1576.

Fuster, V., L. Badimon, J. J. Badimon, J. H. Chesebro (1992a). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)." N Engl J Med **326**(4): 242-250.

Fuster, V., L. Badimon, J. J. Badimon, J. H. Chesebro (1992b). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)." N Engl J Med **326**(5): 310-318.

Fylaktakidou, K. C., D. J. Hadjipavlou-Litina, K. E. Litinas, D. N. Nicolaides (2004). "Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities." Curr Pharm Des **10**(30): 3813-3833.

Gottstein, N., B. A. Ewins, C. Eccleston, G. P. Hubbard, I. C. Kavanagh, A. M. Minihane, P. D. Weinberg, G. Rimbach (2003). "Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function." Br J Nutr **89**(5): 607-616.

Guerrero, J. A., M. L. Lozano, J. Castillo, O. Benavente-Garcia, V. Vicente, J. Rivera (2005). "Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor." J. Thromb. Haemostasis **3**(2): 369-376.

Guerrero, J. A., L. Navarro-Nunez, M. L. Lozano, C. Martinez, V. Vicente, J. M. Gibbins, J. Rivera (2007). "Flavonoids inhibit the platelet TxA(2) signalling pathway and antagonize TxA(2) receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells." Br J Clin Pharmacol **64**(2): 133-144.

Habib, A., G. A. FitzGerald, J. Maclouf (1999). "Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets." J Biol Chem **274**(5): 2645-2651.

Handin, R. I. (1996). "Platelets and coronary artery disease." N Engl J Med **334**(17): 1126-1127.

Hanske, L., G. Loh, S. Sczesny, M. Blaut, A. Braune (2010). "Recovery and metabolism of xanthohumol in germ-free and human microbiota-associated rats." Mol Nutr Food Res **54**(10): 1405-1413.

Harrison, P. (2005). "Platelet function analysis." Blood Rev **19**(2): 111-123.

Harrison, P., E. M. Cramer (1993). "Platelet alpha-granules." Blood Rev **7**(1): 52-62.

Hayward, C. P., E. Furmaniak-Kazmierczak, A. M. Cieutat, J. C. Moore, D. F. Bainton, M. E. Nesheim, J. G. Kelton, G. Cote (1995). "Factor V is complexed with multimerin in resting platelet lysates and colocalizes with multimerin in platelet alpha-granules." J Biol Chem **270**(33): 19217-19224.

Heim, K. E., A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." J Nutr Biochem **13**(10): 572-584.

Hsiao, G., F. N. Ko, T. T. Jong, C. M. Teng (1998). "Antiplatelet action of 3',4'-diisovalerylkhellactone diester purified from Peucedanum japonicum Thunb." Biol Pharm Bull **21**(7): 688-692.

Huang, J. S., S. K. Ramamurthy, X. Lin, G. C. Le Breton (2004). "Cell signalling through thromboxane A2 receptors." Cell Signal **16**(5): 521-533.

Hubbard, G. P., S. Wolffram, J. A. Lovegrove, J. M. Gibbins (2003). "The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function." Proc Nutr Soc **62**(2): 469-478.

Chang, M. C., H. H. Chang, C. P. Chan, H. Y. Chou, B. E. Chang, S. Y. Yeung, T. M. Wang, J. H. Jeng (2012). "Antiplatelet effect of phloroglucinol is related to inhibition of cyclooxygenase, reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production." Toxicol Appl Pharmacol **263**(3): 287-295.

Chen, Y. L., T. C. Wang, S. C. Liang, C. M. Teng, C. C. Tzeng (1996). "Synthesis and evaluation of coumarin alpha-methylene-gamma-butyrolactones: a new class of platelet aggregation inhibitors." Chem Pharm Bull (Tokyo) **44**(8): 1591-1595.

Chen, Y. T., R. L. Zheng, Z. J. Jia, Y. Ju (1990). "Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants." Free Radic Biol Med **9**(1): 19-21.

Chen, Z., S. Zheng, L. Li, H. Jiang (2014). "Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review." Curr Drug Metab **15**(1): 48-61.

Chirumbolo, S. (2012). "Role of quercetin in vascular physiology." Can J Physiol Pharmacol **90**(12): 1652-1657.

Ikeda, Y., K. Shimada, T. Teramoto, S. Uchiyama, T. Yamazaki, S. Oikawa, M. Sugawara, K. Ando, M. Murata, K. Yokoyama, N. Ishizuka (2014). "Low-dose aspirin for primary prevention of cardiovascular events in Japanese patients 60 years or older with atherosclerotic risk factors: a randomized clinical trial." JAMA **312**(23): 2510-2520.

Jian, L. (2009). "Soy, isoflavones, and prostate cancer." Mol Nutr Food Res **53**(2): 217-226.

Jurk, K., B. E. Kehrel (2005). "Platelets: physiology and biochemistry." Semin Thromb Hemost **31**(4): 381-392.

Juurlink, D. N., T. Gomes, D. T. Ko, P. E. Szmitko, P. C. Austin, J. V. Tu, D. A. Henry, A. Kopp, M. M. Mamdani (2009). "A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel." CMAJ **180**(7): 713-718.

Kahn, M. L., M. Nakanishi-Matsui, M. J. Shapiro, H. Ishihara, S. R. Coughlin (1999). "Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin." J Clin Invest **103**(6): 879-887.

Karlickova, J., M. Riha, T. Filipsky, K. Macakova, R. Hrdina, P. Mladenka (2016). "Antiplatelet Effects of Flavonoids Mediated by Inhibition of Arachidonic Acid Based Pathway." Planta Medica **82**(1-02): 76-83.

Kim, D. H., E. A. Jung, I. S. Sohng, J. A. Han, T. H. Kim, M. J. Han (1998). "Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities." Arch Pharmacal Res **21**(1): 17-23.

Kim, I. S., M. Yang, O. H. Lee, S. N. Kang (2011). "The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts."Food Sci Technol **44**(5): 1328-1332.

Kim, J. M., H. S. Yun-Choi (2008). "Anti-platelet effects of flavonoids and flavonoid-glycosides from Sophora japonica." Arch Pharmacal res **31**(7): 886-890.

Kim, Y. P., M. Yamada, S. S. Lim, S. H. Lee, N. Ryu, K. H. Shin, K. Ohuchi (1999). "Inhibition by tectorigenin and tectoridin of prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 induction in rat peritoneal macrophages." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1438**(3): 399-407.

King, A., G. Young (1999). "Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals." J Am Diet Assoc **99**(2): 213-218.

Kitagawa, S., F. Kametani, K. Tsuchiya, H. Sakurai (1990). "ESR analysis with long-chain alkyl spin labels in bovine blood platelets. Relationship between the increase in membrane fluidity by alcohols and phenolic compounds and their inhibitory effects on aggregation." Biochim Biophys Acta **1027**(2): 123-129.

Kokubo, Y., H. Iso, J. Ishihara, K. Okada, M. Inoue, S. Tsugane, J. S. Group (2007). "Association of dietary intake of soy, beans, and isoflavones with risk of cerebral and myocardial infarctions in Japanese populations: the Japan Public Health Center-based (JPHC) study cohort I." Circulation **116**(22): 2553-2562.

Komorsky-Lovric, S., I. Novak (2011). "Abrasive stripping square-wave voltammetry of blackberry, raspberry, strawberry, pomegranate, and sweet and blue potatoes." J Food Sci **76**(6): C916-920.

Kumar, S., A. K. Pandey (2013). "Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview." Sci World J **2013**: 162750.

Kurzer, M. S., X. Xu (1997). "Dietary phytoestrogens." Annu Rev Nutr **17**: 353-381.

Li, T. T., Y. S. Zhang, L. He, N. S. Li, J. Peng, Y. J. Li (2011). "Protective effect of phloroglucinol against myocardial ischaemia-reperfusion injury is related to inhibition of myeloperoxidase activity and inflammatory cell infiltration." Clin Exp Pharmacol Physiol **38**(1): 27-33.

Lill, G., S. Voit, K. Schror, A. A. Weber (2003). "Complex effects of different green tea catechins on human platelets." FEBS Lett **546**(2-3): 265-270.

Lo, W. L., C. C. Wu, F. R. Chang, W. Y. Wang, A. T. Khalil, K. H. Lee, Y. C. Wu (2003). "Antiplatelet and anti-HIV constituents from Euchresta formosana." Nat Prod Res **17**(2): 91-97.

Luceri, C., L. Giannini, M. Lodovici, E. Antonucci, R. Abbate, E. Masini, P. Dolara (2007). "p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity in vitro and in vivo." Br J Nutr **97**(3): 458-463.

Luepke, N. P. (1985). "Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential." Food Chem Toxicol **23**(2): 287-291.

Luepker, R. V., L. M. Steffen, S. Duval, N. D. Zantek, X. Zhou, A. T. Hirsch (2015). "Population Trends in Aspirin Use for Cardiovascular Disease Prevention 1980-2009: The Minnesota Heart Survey." J Am Heart Assoc **4**(12).

Macakova, K., Z. Rehakova, P. Mladenka, J. Karlickova, T. Filipsky, M. Riha, A. K. Prasad, V. S. Parmar, L. Jahodar, P. Pavek, R. Hrdina, L. Saso (2012). "In vitro platelet antiaggregatory properties of 4-methylcoumarins." Biochimie **94**(12): 2681-2686.

Mahaut-Smith, M. P., S. Jones, R. J. Evans (2011). "The P2X1 receptor and platelet function." Purinergic Signal **7**(3): 341-356.

Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Remesy (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." Am J Clin Nutr **81**(1 Suppl): 230S-242S.

Manook, M., J. Kwun, S. Sacks, A. Dorling, N. Mamode, S. Knechtle (2018). "Innate networking: Thrombotic microangiopathy, the activation of coagulation and complement in the sensitized kidney transplant recipient." Transplant Rev (Orlando) **32**(3): 119-126.

Matthies, A., G. Loh, M. Blaut, A. Braune (2012). "Daidzein and genistein are converted to equol and 5-hydroxy-equol by human intestinal Slackia isoflavoniconvertens in gnotobiotic rats." J Nutr **142**(1): 40-46.

McNicol, A., J. M. Gerrard (1993). "Post-receptor events associated with thrombin-induced platelet activation." Blood Coagul Fibrinolysis **4**(6): 975-991.

McNicol, A., S. J. Israels (1999). "Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis." Thromb Res **95**(1): 1-18.

McNicol, A., S. J. Israels (2003). "Platelets and anti-platelet therapy." J Pharmacol Sci **93**(4): 381-396.

McNicol, A. G. J. M. (1997). Platet morphology, aggregation and secretion. Adv Mol Cell Biol. E. G. L. E. Edward Bittar, Elsevier Science 1997. **18:** 1-29.

Miggin, S. M., B. T. Kinsella (1998). "Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A2 receptor (TP) alpha and beta isoforms." Biochim Biophys Acta **1425**(3): 543-559.

Migkos, T., L. Applova, P. Horky, V. Tvrdy, J. Karlickova, K. Macakova, M. Hrubsa, M. C. Catapano, M. Tomanek, M. Pour, P. Mladenka (2019). "The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper." Phytomedicine **62**: 152974.

Michelson, A. D. (2002). Platelets. New York, Academic press/Elsevier Science.

Michelson, A. D. (2004). "Platelet function testing in cardiovascular diseases." Circulation **110**(19): e489-493.

Michelson, A. D., M. R. Barnard, L. A. Krueger, C. R. Valeri, M. I. Furman (2001). "Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction." Circulation **104**(13): 1533-1537.

Minamino, T., M. Kitakaze, S. Sanada, H. Asanuama, T. Kurotobi, Y. Koretsune, M. Fukunami, T. Kuzuya, N. Hoki, M. Hori (1998). "Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation: role of nitric oxide." Circulation **98**(17): 1721-1727.

Miner, J., A. Hoffhines (2007). "The discovery of aspirin's antithrombotic effects." Texas Heart Institute Journal **34**(2): 179-186.

Mladenka, P., L. Zatloukalova, T. Filipsky, R. Hrdina (2010). "Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity." Free radical biol Med **49**(6): 963-975.

Mortensen, S. B., S. B. Larsen, E. L. Grove, S. D. Kristensen, A. M. Hvas (2010). "Reduced platelet response to aspirin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus." Thromb Res **126**(4): e318-322.

Mugosa, S., N. Djordjevic, Z. Bukumiric, N. Djukanovic, J. Cukic, I. Radosavljevic, D. Baskic, D. Protic, M. Zdravkovic, Z. Todorovic (2015). "PREDICT score and CYP2C19 polymorphism independently predict lack of efficacy of clopidogrel in cardiology patients." Clin Exp Pharmacol Physiol.

Muir, R. M., A. M. Ibanez, S. L. Uratsu, E. S. Ingham, C. A. Leslie, G. H. McGranahan, N. Batra, S. Goyal, J. Joseph, E. D. Jemmis, A. M. Dandekar (2011). "Mechanism of gallic acid biosynthesis in bacteria (Escherichia coli) and walnut (Juglans regia)." Plant Mol Biol **75**(6): 555-565.

Munoz, Y., A. Garrido, L. Valladares (2009). "Equol is more active than soy isoflavone itself to compete for binding to thromboxane A(2) receptor in human platelets." Thromb Res **123**(5): 740-744.

Najmanova, I., M. Dosedel, R. Hrdina, P. Anzenbacher, T. Filipsky, M. Riha, P. Mladenka (2015). "Cardiovascular effects of coumarins besides their antioxidant activity." Curr Top Med Chem **15**(9): 830-849.

Najmanova, I., J. Pourova, M. Voprsalova, V. Pilarova, V. Semecky, L. Novakova, P. Mladenka (2016). "Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats." Mol Nutr Food Res **60**(5): 981-991.

Nakashima, S., T. Koike, Y. Nozawa (1991). "Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, inhibits thromboxane A2-mediated human platelet responses." Mol Pharmacol **39**(4): 475-480.

Navarro-Nunez, L., J. Castillo, M. L. Lozano, C. Martinez, O. Benavente-Garcia, V. Vicente, J. Rivera (2009). "Thromboxane A2 receptor antagonism by flavonoids: structure-activity relationships." J Agricl Food Chem **57**(4): 1589-1594.

Noris, P., F. Melazzini, C. L. Balduini (2016). "New roles for mean platelet volume measurement in the clinical practice?" Platelets **27**(7): 607-612.

Ostertag, L. M., N. O'Kennedy, G. W. Horgan, P. A. Kroon, G. G. Duthie, B. de Roos (2011). "In vitro anti-platelet effects of simple plant-derived phenolic compounds are only found at high, non-physiological concentrations." Mol Nutr Food Res **55**(11): 1624-1636.

Pandey, K. B., S. I. Rizvi (2009). "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease." Oxid Med and Cell Longevity **2**(5): 270-278.

Pase, M. P., N. A. Grima, J. Sarris (2011). "The effects of dietary and nutrient interventions on arterial stiffness: a systematic review." Am J Clin Nutr **93**(2): 446-454.

Pei, K., J. Ou, J. Huang, S. Ou (2016). "p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities." J Sci Food Agric **96**(9): 2952-2962.

Pimpao, R. C., M. R. Ventura, R. B. Ferreira, G. Williamson, C. N. Santos (2015). "Phenolic sulfates as new and highly abundant metabolites in human plasma after ingestion of a mixed berry fruit puree." Br J Nutr **113**(3): 454-463.

Pletscher, A., M. Da Prada, K. H. Berneis, J. P. Tranzer (1971). "New aspects on the storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets." Experientia **27**(9): 993-1002.

Plumb, G. W., M. T. Garcia-Conesa, P. A. Kroon, M. Rhodes, S. Ridley, G. Williamson (1999). "Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora." J Sci Food Agric **79**(3): 390-392.

Porcellati, S., V. Costantini, M. Prosdocimi, M. Stasi, R. Pistolesi, G. G. Nenci, G. Goracci (1990). "The coumarin derivative AD6 inhibits the release of arachidonic acid by interfering with phospholipase A2 activity in human platelets stimulated with thrombin." Agents Actions **29**(3-4): 364-373.

Pourova, J., I. Najmanova, M. Voprsalova, T. Migkos, V. Pilarova, L. Applova, L. Novakova, P. Mladenka (2018). "Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo." Vascul Pharmacol **111**.

Quideau, S., D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouysegu (2011). "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis." Angew Chem Int Ed Engl **50**(3): 586-621.

Rasmussen, S. E., H. Frederiksen, K. Struntze Krogholm, L. Poulsen (2005). "Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease." Mol Nutr Food Res **49**(2): 159-174.

Rechner, A. R., J. P. Spencer, G. Kuhnle, U. Hahn, C. A. Rice-Evans (2001). "Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo." Free Radic Biol Med **30**(11): 1213-1222.

Rendu, F., B. Brohard-Bohn (2001). "The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions." Platelets **12**(5): 261-273.

Ribaldi, E., A. M. Mezzasoma, E. Francescangeli, M. Prosdocimi, G. G. Nenci, G. Goracci, P. Gresele (1996). "Inhibition of PAF synthesis by stimulated human polymorphonuclear leucocytes with cloricromene, an inhibitor of phospholipase A2 activation." Br J Pharmacol **118**(6): 1351-1358.

Robbins, R. J. (2003). "Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology." J Agric Food Chem **51**(10): 2866-2887.

Roberts, D. E., A. McNicol, R. Bose (2004). "Mechanism of collagen activation in human platelets." J Biol Chem **279**(19): 19421-19430.

Roger, V. L., A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, E. J. Benjamin, J. D. Berry, W. B. Borden, D. M. Bravata, S. Dai, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, S. M. Hailpern, J. A. Heit, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, E. Z. Soliman, P. D. Sorlie, N. Sotoodehnia, T. N. Turan, S. S. Virani, N. D. Wong, D. Woo, M. B. Turner, C. American Heart Association Statistics, S. Stroke Statistics (2012). "Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association." Circulation **125**(1): e2-e220.

Roma, G., M. D. Braccio, A. Carrieri, G. Grossi, G. Leoncini, M. Grazia Signorello, A. Carotti (2003). "Coumarin, chromone, and 4(3H)-pyrimidinone novel bicyclic and tricyclic derivatives as antiplatelet agents: synthesis, biological evaluation, and comparative molecular field analysis." Bioorg Med Chem **11**(1): 123-138.

Rosenbruch, M. (1994). "[Early stages of the incubated chicken egg as a model in experimental biology and medicine]." Altex **11**(4): 199-206.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.

Rufer, C. E., S. E. Kulling (2006). "Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays." J. Agric. Food Chem. **54**(8): 2926-2931.

Ruggeri, Z. M. (2000). "Old concepts and new developments in the study of platelet aggregation." J Clin Invest **105**(6): 699-701.

Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." Nat Med **8**(11): 1227-1234.

Rumbaut, R. E., P. Thiagarajan (2010). Platelet-Vessel Wall Interactions in Hemostasis and Thrombosis. San Rafael (CA).

Russo, A., R. Acquaviva, A. Campisi, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, G. Virgata, M. L. Barcellona, A. Vanella (2000). "Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors." Cell Biol Toxicol **16**(2): 91-98.

Sacco, M., F. Pellegrini, M. C. Roncaglioni, F. Avanzini, G. Tognoni, A. Nicolucci, P. P. P. C. Group (2003). "Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial." Diabetes Care **26**(12): 3264-3272.

Sagara, M., T. Kanda, N. J. M, T. Teramoto, L. Armitage, N. Birt, C. Birt, Y. Yamori (2004). "Effects of dietary intake of soy protein and isoflavones on cardiovascular disease risk factors in high risk, middle-aged men in Scotland." J Am Coll Nutr **23**(1): 85-91.

Sangkuhl, K., A. R. Shuldiner, T. E. Klein, R. B. Altman (2011). "Platelet aggregation pathway." Pharmacogenet Genomics **21**(8): 516-521.

Setchell, K. D., N. M. Brown, P. Desai, L. Zimmer-Nechemias, B. E. Wolfe, W. T. Brashear, A. S. Kirschner, A. Cassidy, J. E. Heubi (2001). "Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements." J Nutr **131**(4 Suppl): 1362S-1375S.

Setchell, K. D., C. Clerici (2010). "Equol: pharmacokinetics and biological actions." J Nutr **140**(7): 1363S-1368S.

Setchell, K. D., C. Clerici (2010b). "Equol: history, chemistry, and formation." J. Nutr. **140(7)**(7): 1355S-1362S.

Schneider, H., A. Schwiertz, M. D. Collins, M. Blaut (1999a). "Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract." Arch Microbiol **171**(2): 81-91.

Schneider, H., A. Schwiertz, M. D. Collins, M. Blaut (1999b). "Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract." Arch Microbiol **171**(2): 81-91.

Sims, P. J., T. Wiedmer, C. T. Esmon, H. J. Weiss, S. J. Shattil (1989). "Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity." J Biol Chem **264**(29): 17049-17057.

Singbartl, K., S. B. Forlow, K. Ley (2001). "Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure." FASEB J **15**(13): 2337-2344.

Skaer, R. J., P. D. Peters, J. P. Emmines (1974). "The localization of calcium and phosphorus in human platelets." J Cell Sci **15**(3): 679-682.

Sundstrom, J., J. Hedberg, M. Thuresson, P. Aarskog, K. M. Johannesen, J. Oldgren (2017). "Low-Dose Aspirin Discontinuation and Risk of Cardiovascular Events: A Swedish Nationwide, Population-Based Cohort Study." Circulation **136**(13): 1183-1192.

Suzuki, H., Y. Katagiri, S. Tsukita, K. Tanoue, H. Yamazaki (1990). "Localization of adhesive proteins in two newly subdivided zones in electron-lucent matrix of human platelet alpha-granules." Histochemistry **94**(4): 337-344.

Tahara, Y., S. Omori, A. Hashimoto (1983). "Formation of Embryo Thromboblasts in Chick Blastoderm - Morphology, Site of Production and Time of Emergence in the Blood." Dev Growth & Differ **25**(1): 75-83.

Teng, C. M., H. L. Li, T. S. Wu, S. C. Huang, T. F. Huang (1992). "Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources." Thromb Res **66**(5): 549-557.

Tsuchiya, H. (2001). "Biphasic membrane effects of capsaicin, an active component in Capsicum species." J Ethnopharmacol **75**(2-3): 295-299.

van der Velpen, V., P. C. Hollman, M. van Nielen, E. G. Schouten, M. Mensink, P. Van't Veer, A. Geelen (2014). "Large inter-individual variation in isoflavone plasma concentration limits use of isoflavone intake data for risk assessment." Eur J Clin Nutr **68**(10): 1141-1147.

Varga-Szabo, D., I. Pleines, B. Nieswandt (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 403-412.

Vergne, S., K. Titier, V. Bernard, J. Asselineau, M. Durand, V. Lamothe, M. Potier, P. Perez, J. Demotes-Mainard, P. Chantre, N. Moore, C. Bennetau-Pelissero, P. Sauvant (2007). "Bioavailability and urinary excretion of isoflavones in humans: effects of soy-based supplements formulation and equol production." J Pharm Biomed Anal **43**(4): 1488-1494.

Vilar, S., E. Quezada, L. Santana, E. Uriarte, M. Yanez, N. Fraiz, C. Alcaide, E. Cano, F. Orallo (2006). "Design, synthesis, and vasorelaxant and platelet antiaggregatory activities of coumarin-resveratrol hybrids." Bioorg Med Chem Lett **16**(2): 257-261.

Vogiatzoglou, A., A. A. Mulligan, R. N. Luben, M. A. Lentjes, C. Heiss, M. Kelm, M. W. Merx, J. P. Spencer, H. Schroeter, G. G. Kuhnle (2014). "Assessment of the dietary intake of total flavan-3-ols, monomeric flavan-3-ols, proanthocyanidins and theaflavins in the European Union." Br J Nutr **111**(8): 1463-1473.

Walle, T. (2004). "Absorption and metabolism of flavonoids." Free Radical Biol Med **36**(7): 829-837.

Wang, H., M. G. Nair, G. M. Strasburg, A. M. Booren, I. Gray, D. L. Dewitt (2000). "Cyclooxygenase active bioflavonoids from Balaton tart cherry and their structure activity relationships." Phytomedicine **7**(1): 15-19.

Watala, C., J. Pluta, J. Golanski, M. Rozalski, M. Czyz, Z. Trojanowski, J. Drzewoski (2005). "Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin." J Mol Med (Berl) **83**(2): 148-158.

Weyrich, A. S., H. Schwertz, L. W. Kraiss, G. A. Zimmerman (2009). "Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives." J Thromb Haemost **7**(2): 241-246.

White, J. G. (1972). "Interaction of membrane systems in blood platelets." Am J Pathol **66**(2): 295-312.

Williamson, G., M. N. Clifford (2010). "Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?" Br J Nutr **104 Suppl 3**: S48-66.

Woclawek-Potocka, I., M. M. Bah, A. Korzekwa, M. K. Piskula, W. Wiczkowski, A. Depta, D. J. Skarzynski (2005). "Soybean-derived phytoestrogens regulate prostaglandin secretion in endometrium during cattle estrous cycle and early pregnancy." Exp. Biol. Med. (Maywood) **230**(3): 189-199.

Wright, B., T. Gibson, J. Spencer, J. A. Lovegrove, J. M. Gibbins (2010a). "Platelet-mediated metabolism of the common dietary flavonoid, quercetin." PLoS One **5**(3): e9673.

Wright, B., L. A. Moraes, C. F. Kemp, W. Mullen, A. Crozier, J. A. Lovegrove, J. M. Gibbins (2010b). "A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids." Br J Pharmacol **159**(6): 1312-1325.

Wu, B., K. Kulkarni, S. Basu, S. Zhang, M. Hu (2011). "First-pass metabolism via UDP-glucuronosyltransferase: a barrier to oral bioavailability of phenolics." J Pharm Sci **100**(9): 3655-3681.

Wu, L., X. Wang, W. Xu, F. Farzaneh, R. Xu (2009). "The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives." Curr Med Chem **16**(32): 4236-4260.

Wu, Z. K., J. J. Wang, T. Wang, S. S. Zhu, X. L. Chen, C. Liu, W. G. Zhang (2015). "Clopidogrel resistance response in patients with coronary artery disease and metabolic syndrome: the role of hyperglycemia and obesity." J Geriatr Cardiol **12**(4): 378-382.

You, K. M., H. G. Jong, H. P. Kim (1999). "Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets by polyhydroxylated/methoxylated flavonoids isolated from medicinal plants." Arch Pharmacal Res **22**(1): 18-24.

12 PŘÍLOHY

12.1 Publikace vztahující se k tématu disertační práce aktuálně v recenzním řízení

4-Methylcatechol, a flavonoid metabolite with potent antiplatelet effects

Lenka Applová[1], Jana Karlíčková[2], Paul Warncke[3], Kateřina Macáková[2], Marcel Hrubša[1], Miloslav Macháček[4], Václav Tvrdý[1], Dagmar Fischer[3], Přemysl Mladěnka[1,*]

[1]Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

[2]Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

[3] Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Institute of Pharmacy, Friedrich-Schiller-University Jena, Lessingstr. 8, 07743 Jena, Germany

[4] Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

* Corresponding author: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka; Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Akademika Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic, Tel: +420 495067295, Fax: +420 495067170, E-mail: mladenkap@faf.cuni.cz

Key words

4-methylcatechol, aggregation, flavonoid, metabolite, platelet, pyrogallol

Abbreviations

4-MC, 4-methylcatechol; AA, arachidonic acid; ASA, acetylsalicylic acid; ADP, adenosindiphosphate; COX-1, cyclooxygenase-1; HET-CAV, *Ex ovo* hen's egg test on chick area vasculosa; PRP, platelet rich plasma; TRAP-6, thrombin receptor activating peptide-6; TXA_2, thromboxane A_2

Abstract

Scope: Intake of flavonoids from the diet can be substantial, and epidemiological studies suggested that these compounds can decrease the incidence of cardiovascular diseases by involvement with increased platelet aggregation. Although parent flavonoids possess antiplatelet effects, the clinical importance is disputable due to their very low bioavailability. Most of them are metabolized by human colon bacteria to smaller phenolic compounds, which reach higher plasma concentrations than the parent flavonoids. In this study, a series of 29 known flavonoid metabolites was tested for antiplatelet potential.

Methods and results: Four compounds appeared to have a biologically relevant antiplatelet effect using whole human blood. 4-Methylcatechol (4-MC) was clearly the most efficient being about 10x times more active than clinically used acetylsalicylic acid. This *ex vivo* effect was also confirmed using a potentially novel *in vivo*-like *ex ovo* hen´s egg model of thrombosis, where 4-MC significantly increased the survival of the eggs. The mechanism of action was studied and it seems that it is mainly based on the influence of intracellular calcium signalling.

Conclusion: This study showed that some flavonoid metabolites formed by human microflora have a strong antiplatelet effect. This information can help to explain the antiplatelet potential of orally given flavonoids.

1 Introduction

Flavonoids, a group of naturally occurring plant secondary metabolites, are contained in many fruits, vegetables, herbs, spices, and beverages produced from flavonoid rich sources. Hence the human intake of them, both in the mentioned food, as well as from food supplements, is considerable.[1, 2] It is, therefore, not surprising that these compounds are being largely tested for their possible effects on human health. Positive influence on cardiovascular diseases and cancer are among the most cited. Concerning cardiovascular diseases and higher flavonoid intake, there are reports of lower risk of coronary artery disease and also ischemic stroke.[3, 4] Since approved antiplatelet drugs are used for the prevention of both coronary artery disease and ischemic stroke,[5] it is tempting to associate this finding, at least partially, with the antiplatelet effects of flavonoids and/or their metabolites,[6, 7] but clear proof is missing.

The bioavailability of parent flavonoids is considered to be very low.[8] Notwithstanding if they are consumed either as glycosides, the predominant form in the diet, or as aglycones, a large portion of flavonoids enters the colon where they are metabolized to smaller phenolic compounds. Experiments with either rats treated with antibiotics[9] or germ-free rats[10] confirmed the key role of colon bacteria in the formation of these metabolites. In general, these phenolics include, in the case of flavonoids, mainly benzoic, phenylpropionic and phenylacetic acids, as well as hydroxybenzenes, whereas for isoflavonoids, related compounds such as equol, desmethylangolensin, 4-ethylphenol and resorcinol.[11-14] These phenolic compounds are

subsequently absorbed into the systemic circulation, where some of them reach higher concentrations than those of the parent flavonoids.[12, 15-17] Therefore, the contribution of these metabolites to the effect of the parent flavonoids cannot be excluded. Indeed, some of them have documented positive effects *in vivo*, e.g. a) 3-phenylpropionic, 3-hydroxyphenylacetic and 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acids were able to decrease COX-2 protein levels and subsequently PGE_2 production in colon cancer cells,[18] b) 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid decreased arterial blood pressure in a model of hypertension[19] and c) there are also some reports of antiplatelet activity.[7, 11, 20, 21] The first study from 1998 demonstrated antiplatelet effects of several flavonoid metabolites, including pyrogallol and phloroglucinol[11] on a semiquantitative scale. Much later the mechanism of action of phloroglucinol was characterized by Chang et al.[20] Other available studies tested mostly small food phenolic compounds which were in general either inactive or for which very low activity was observed on platelet aggregation triggered by collagen.[7, 21] The study of Ostertag et al.[21] included also hydroxybenzenes (resorcinol, catechol and pyrogallol) and their antiplatelet potential against collagen was demonstrated. Hence, the assumption is reasonable that small phenolic metabolites can participate in the antiplatelet effect of parent flavonoids. Currently, there is little data comparing the antiplatelet potential of a large group of small phenolics formed from flavonoids by human microflora. Therefore, the goal of this study was to analyse the antiplatelet effects of commercially available metabolites, including the determination of their mechanism of action in *ex vivo* conditions under biologically relevant conditions using whole human blood. The effect of the most potent metabolites, 4-methylcatechol and pyrogallol, were also confirmed using the HET-CAV model (hen's egg test on chick area vasculosa) – a novel *ex ovo* model of thrombosis which mimics the situation *in vivo*.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

Indomethacin, ticagrelor, EDTA, terutroban, acetylsalicylic acid (ASA), 1-benzylimidazole, kaempferol, epicatechin and calcium ionophore A23187 were purchased from Sigma Aldrich (Prague, Czech Republic). Arachidonic acid (AA), adenosine-5´diphosphate (ADP), thrombin receptor activating peptide-6 (TRAP-6), and the GPIIb/IIIa antagonist tirofiban were bought from Medista (Prague, Czech Republic), heparin sodium from Zentiva (Prague, Czech Republic), U-46619, thromboxane B_2 EIA kit, prostaglandin H_2 and COX inhibitor screening assay kit from Cayman Chemical Company (MI, USA), Serotonin Elisa kit from Abcam (Cambridge, UK), and collagen from Diagnostica a.s. (Prague, Czech Republic), while DMSO and 96% ethanol were bought from Penta (Prague, Czech Republic). Sodium chloride (0.9%) was purchased from B. Braun (Prague, Czech Republic).

2.2 Tested compounds

(2*RS*)-2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (≥95%), 3-phenylpropionic acid (≥99%), 3-(3,5-dihydroxyphenyl)propionic acid (≥95%), 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid (≥98%), 3-(2,4-dihydroxyphenyl)propionic acid (≥95%), hippuric acid (≥98%), 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid (homovanillic acid ≥97%), phenylacetic acid (≥99%), 4-(hydroxymethyl)phenylacetic acid (≥98%), 4-hydroxyphenylacetic acid (≥98%), 2-hydroxyphenylacetic acid (≥99%), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (≥98%), 3-hydroxyphenylacetic acid (≥99%), 3-hydroxy-4-methoxyphenylacetic acid (≥97%), 3,4-dihydroxybenzoic acid (≥97%), 3-hydroxybenzoic acid (≥99%), 4-hydroxybenzoic acid (≥99%), benzoic acid (≥99,5%), 2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (≥99%), 2,4-dihydroxybenzoic acid (≥97%), 2,4,6-trihydroxybenzoic acid (≥90%), 2,4-dihydroxyacetophenone (≥99%), resorcinol (≥99%), pyrogallol (≥98%), phloroglucinol (≥99%), 4-methylcatechol (4-MC, ≥95%) were from Sigma Aldrich, 3-coumaric acid (≥90%) from Extrasynthese, and 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid and 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid (*purity not specified*) from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada).

2.3 Blood volunteers

Blood samples from 43 non-smoking volunteers were collected by venipuncture into plastic disposable syringes containing heparin sodium (170 IU/10 mL). For specific experiments, either a COX inhibitor, indomethacin, or a thromboxane synthase inhibitor, 1-benzylimidazole, were immediately added to the collected blood at a final concentration of 10 µM. All healthy volunteers had not taken any medication for at least 14 days prior to blood collection, had not consumed any alcohol in the last 12 hours and given written informed consent for the study. The study was performed under the supervision of the Ethics Committee of Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové (approval date: November 12, 2012) and conforms to the latest Declaration of Helsinki. Platelet rich plasma (PRP) was obtained as a supernatant by centrifuging the blood for 8 minutes at 214 *g* (centrifuge VWR Compact Star CS4, VWR International Ltd, U.K.). The platelet count was determined using a BD AccuriC6 flow cytometer equipped with BD CF low Software (BD AccuriCytometers Inc., U.S.A.). The concentration of PRP was adjusted by use of autologous platelet poor plasma.

2.4 Platelet aggregation induced by AA, collagen, ADP, TRAP-6 and calcium ionophore A23187

The aggregometer Multiplate (Roche, Switzerland) was used for these measurements. This aggregometer measures the impedance between two pairs of electrodes submerged in continuously stirred blood.[22] Whole blood (300 µL) was diluted with an equivalent volume of preheated 0.9% sodium chloride and incubated with 5 µL of the appropriate test compound (dissolved in DMSO, final concentration < 1%) for 3 minutes at 37°C. Platelet aggregation was then induced by different inducers. The reaction was followed for 6 minutes and expressed as

area under the curve. Due to inter-individual differences in human blood samples, calibration was always carried out; the dose of inducer was gradually increased in order to construct concentration-response curves and to find the lowest dose to evoke the maximal platelet aggregation (first calibration). Specific known antagonists/inhibitors were used for the second calibration. ASA was employed as the standard for AA and collagen induced aggregation together with kaempferol, while ticagrelor was used as an antagonist for the ADP (P2Y12) receptor and tirofiban was employed as a GPIIb/IIIa antagonist in the TRAP-6 (a PAR1 receptor agonist) assay. The final concentration of AA was in the range of 113 – 196 µM, and analogous procedures were used for the other mentioned inducers: the final concentrations of collagen were in the range of 0.41 – 1.22 µg/mL, while those of ADP, TRAP-6 and calcium ionophore were 8, 18 and 8 µM, respectively.

2.5 Cyclooxygenase-1 inhibition

For the ELISA assessment of COX-1 inhibition, a commercial set from Cayman Chemicals was used.[23] ASA and the tested compounds were incubated with ovine COX-1 at 37°C, and AA, in a final concentration of 100 µM, was added to the mixture to start the reaction. The formed prostaglandin H_2 was measured following its reduction to prostaglandin $F_{2\alpha}$ by stannous chloride. The percentage of inhibition was related to the positive control containing only the solvent and AA. Analogously, PRP with a platelet concentration of 3.5 x 10^8 per mL was used instead of ovine COX-1 for testing of inhibition of human COX-1. The blood was pre-treated with 1-benzylimidazole to avoid further metabolism of prostaglandin H_2 and ASA was used as the standard.

2.6 Thromboxane A_2 synthase inhibition and thromboxane content measurement inside the cells

This inhibition was evaluated according to Chang at al.[24], with a few modifications. PRP with a platelet concentration of 3.5 x10^8 per mL was incubated with the test compounds for 3 minutes at 37 °C. After addition of prostaglandin H_2 (50 ng), the mixture was incubated precisely for an additional 5 minutes. The incubation was terminated by addition of chilled EDTA (2 mM) and the thromboxane B_2 levels in the supernatant were measured using a commercial set from Cayman Chemicals.[25] Results were compared with those of 1-benzylimidazole, a known inhibitor of thromboxane A_2 synthase.

In additional experiments, the intracellular content of thromboxane B_2 was measured. The experiments were essentially the same with the exception of the addition of terutroban to a final concentration of 2 µM together with indomethacin to the collected blood in order to block the activation of the platelets via thromboxane receptors. After treatment with prostaglandin H_2 and EDTA, the supernatant was discarded and the platelets were lysed by use of ultrasound and

distilled water for 15 minutes, and the thromboxane B_2 levels were measured by the same ELISA method.

2.7 Antagonism at thromboxane receptors

Antagonism at thromboxane A_2 receptors was analysed using the aggregometer Multiplate. The procedure was similar to that described in 2.4, but the aggregation was induced by the addition of U-46619, a stable agonist of thromboxane A_2 receptors. For comparison and standardization, terutroban was used. The final concentration of U-46619 was in the range of 0.08 – 0.11 µM. The standard turbidimetric method with the aggregometer Chrono-log 500-Ca (Chrono log Co., USA) connected to the computer (Aggro/Link software, Chrono-Log Co.) was used for confirmation of the obtained data.[26]

2.8 Serotonin release

Release of serotonin from human platelets was measured by using the ELISA test (Abcam, Cambridge, UK). PRP with a platelet concentration of 4.5 x 10^8 per mL was incubated with either the appropriate test compound or a standard for 5 minutes. After this time, arachidonic acid at a final concentration of 500 µM was added as the inducer of serotonin release. The reaction was stopped precisely after 4 minutes by addition of chilled EDTA (2 mM). The concentration of serotonin was measured in the supernatant after centrifugation for 10 minutes at 2500 *g* (centrifuge MPW-52, MPV Med. Instruments, Poland).

2.9 Influence of complexation with metals on antiplatelet effect of 4-MC

Water solution of 4-MC was incubated for 5 minutes either with $CaCl_2$, $MgSO_4$ or $FeSO_4$ in a ratio 1:1, the formed complexes were incubated with blood, and platelet aggregation was triggered by the addition of AA. The differences between platelet aggregations were determined using the procedure from 2.4.

2.10 Confocal microscopy

For detection of morphological changes, platelet rich plasma was incubated with a tested compound, dissolved in saline, at 37°C and continuously stirred. For toxicity experiments, the incubation was monitored for 10 minutes, while in the case of platelet activation, AA was added after 3 minutes of incubation at a concentration activating the platelets but not producing aggregates visible by naked eye. The samples were taken in this case 90 seconds after addition of AA. Untreated platelet rich plasma was used as a control in both experiments. Samples (20 µL) were placed between glass slide and cover-glass and immediately imaged. Image acquisition was performed using laser confocal microscopy system Nikon A1+ (Nikon, Japan) equipped with 60× oil immersion objective lens and differential interference contrast (transmission detector and 488 nm laser). One confocal was taken for each field of view.

2.11 *In vivo* (*ex ovo*) hen's egg test on the chick area vasculosa (HET-CAV model)

To investigate the effect of the test compounds in a dynamic and complex biological test system, a shell less hen's egg test on chick area vasculosa (HET-CAV) was used according to Schlenk et al. and Tesch et al. 2017).[27, 28] Briefly, fertilized eggs were incubated at 37 °C and 80% relative humidity for 72 hours. After incubation, eggs were transferred into Petri dishes containing Ringer's solution, pH 7.0. For the experiments, only eggs with an intact yolk sac and a well-developed chick area vasculosa, according to Hamburger and Hamilton stages 14-17[29], were selected for further incubation over 24 hours. Test samples and ASA were diluted in 0.9% sodium chloride to 5 mM concentrations. All the solutions were prepared on the day of the experiment. A volume of 2 µL of each sample was injected into the upper or lower vitelline vein of the CAV using a micro injector (Sutter instrument Company, Novato, CA, USA) connected to a borosilicate glass capillary (World Precision Instruments, Berlin, Germany). After one hour, aggregation was induced by local application of AA (10 µL, 15 mM, dissolved in ultrapure water) in sterile ethylene propylene diene monomer (EPDM) rubber O-rings (Kremer GmbH, Wächtersbach, Germany) placed on one side of the CAV. Eggs injected with 0.9% sodium chloride followed by local application of 10 µL ultrapure water were used as negative controls (solvent, no thrombosis). In contrast, eggs treated with locally applied 15 mM AA after injection of 0.9% saline were selected as the positive control for thrombosis. Digital images of each egg were taken 5, 10, 20, and 40 minutes, 1, 2, 4, 8 and 24 hours after addition of AA. At each time point, eggs were analysed for toxic reactions (thrombosis, haemorrhage) and lethality (stop of heart beat). Blinded evaluation assessed the occurrence of thrombosis, its size and eventually cessation of heart beat at every time of observation. The results from these observations are presented as averages. This evaluation was carried out by 3 independent researchers using a 10-point score system for each ring (20 points meant no thrombosis in both rings). The points were averaged. Each compound was tested in at least two independent experiments with a minimum total number of 15 eggs.

2.12 Mathematical and statistical analysis

Data are shown as means ± SD. One-way ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test were used to determine the differences between compounds. Embryo survival was checked by the Kaplan-Meier survival test (Gehan-Breslow-Wilcoxon test). All statistical evaluation was carried out using GraphPad Prism, version 8.00 (GraphPad Software, San Diego, USA).

3 Results

3.1 Initial screening

In the first step, 29 flavonoid metabolites were screened for their potential antiplatelet effect at a high concentration of 240 µM against platelet aggregation induced by AA. A significant antiplatelet potential in comparison with the solvent was observed for only 5 compounds among

the propionic, acetic and benzoic acids. It was, however, relatively weak in all cases. On the other hand, all four hydroxybenzenes, resorcinol, pyrogallol, phloroglucinol and 4-MC, behaved as strong antiplatelet compounds that reached, with the exception of resorcinol, the effect of clinically used acetylsalicylic acid (Figure 1A). Since such a high concentration is therapeutically unachievable through either the dietary flavonoids or food supplements,[12, 16, 30] these active compounds were tested at lower concentrations to establish their concentration-response curves (Figure 1B) and, subsequently, IC_{50} values (Figure 1C). The results clearly differentiated the compounds into three categories: resorcinol and phloroglucinol with IC_{50} values of about 100 µM; pyrogallol with a comparable effect to ASA having an IC_{50} of about 25 µM, and 4-MC, with the best effect and an IC_{50} more than 10 times lower than that of ASA.

3.2 Testing of mechanism of action

To elucidate the mechanism of action, the four above mentioned active metabolites were tested on all three known single steps of the AA based pathway. The first step is the transformation of AA into prostaglandin H_2 by COX-1. Initially, recombinant ovine COX-1 was employed. As expected, ASA demonstrated a clear effect. However, phloroglucinol and resorcinol appeared to have at least the same potency, while pyrogallol had only a very weak effect and 4-MC was without any effect up to a tested concentration of 100 µM (Figure 2A). To confirm these results under more biologically relevant conditions, these two active metabolites were tested on COX-1 inhibition using human PRP. Under this condition, the similar activity of resorcinol and ASA was confirmed, while the influence of phloroglucinol was clearly, at least in higher concentrations, weaker (Figure 2B).

Prostaglandin H_2 is subsequently transformed to thromboxane A_2 in the second step of this pathway via thromboxane A_2 synthase. At a high concentration of 100 µM, phloroglucinol and 4-MC inhibited about 30% of enzymatic activity, which is markedly less than that of the standard 1-benzylimidazole (Figure 2C).

Following synthesis, thromboxane A_2 binds to its receptors on the platelet surface. None of the four tested metabolites was, however, able to inhibit this step significantly, even at a concentration of 240 µM *(data not shown).*

4-MC was a very potent inhibitor of AA triggered aggregation, although its effect on the individual steps in the mainstream AA-based pathway was weak. Therefore, other less known mechanisms were evaluated. The effect could reside in inhibition of thromboxane trafficking or be based on another related pathway. Hence, we firstly tested if 4-MC can entrap thromboxane intracellularly. Platelets were treated with AA, subsequently lysed, and the intracellular thromboxane content analysed. However, again no effect of 4-MC was demonstrated in contrast to 1-benzylimidazole (Figure S2). Therefore other aggregatory pathways and release of serotonin

were tested in order to obtain more insight into the possible antiaggregatory mechanism of 4-MC. Platelet aggregation triggered neither by ADP nor TRAP-6, a potent activator of thrombin receptor PAR-1 without pro-coagulant activity of parent thrombin, was significantly inhibited by 4-MC (*data not shown*). On the other hand, platelet aggregation initiated by a more physiological inducer, collagen, was again strongly inhibited by 4-MC. In the collagen assay, determination of an IC_{50} value is hardly achievable since even ASA at higher concentrations produces only about 50% inhibition. Therefore, we used IC_{25} (concentration needed to decrease the aggregation to 75% of the initial value) for the comparison. The potent antiplatelet potential of 4-MC was confirmed with IC_{25} values about 10 times lower than those of ASA (Figure 3A,B). Further, we focused on testing whether 4-MC could prevent the release of 5-HT from platelets. Again in this assay, 4-MC reached activity in units of µM concentrations (Figure 4A). In comparison with ASA, the effect of 4-MC started at lower concentrations, and inhibitory curves of ASA and 4-MC had different shapes confirming different mechanism of action.

Summarizing these experiments, 4-MC must have a specific effect which blocks certain but not all aggregatory pathways. Direct toxicity on platelets was not likely and indeed there was no difference in release of lactate dehydrogenase between PRP treated with either saline or 4-MC (Figure S3). Moreover, the confocal imaging confirmed no changes in morphology of platelets after addition of a final concentration of 100 µM of 4-MC (Figure S4). Since 4-MC contains a metal chelation site (o-dihydroxygroup),[31] the possible effect of chelation of calcium by 4-MC was investigated. However, mixing of 4-MC with neither calcium nor magnesium abolished its antiplatelet effects. Only iron significantly, but mildly, decreased the antiplatelet effect of 4-MC (Figure S5). Even if calcium was not directly affected, its intracellular signalling pathway can be modified, as well as by other mechanisms. In the next experiments, we tested the effect of 4-MC on calcium ionophore A23187 induced aggregation. This compound transports calcium from the extracellular side and intracellular stores in the cytosol; ASA is not active in this pathway.[32] 4-MC affected this pathway even at low concentrations and this might be its major mechanism of action (Figure 4B). This is in line with the fact that 4-MC inhibited even the initial formation of clusters of platelets (Figure S6).

3.3 Confirmation of antiplatelet effect in a complex biological model of thrombosis

Finally, to confirm the biological relevance, the effects of 4-MC, ASA and pyrogallol were compared on HET-CAV, a potentially novel *in vivo* model for thrombosis. This model represents a suitable test system that is typically used to investigate the toxic effects of materials and compounds in large numbers in a living system without being an animal test.[27, 28] In the present study, the HET-CAV was modified to investigate the antithrombotic potential of the compounds. In the first step, the model had to be adapted and validated to accomplish justified and reproducible outcomes, and test conditions had to be defined. Preliminary experiments showed that repeated intravenous administration (a tested compound and the inducer) was

disadvantageous due to 1) more intense unspecific bleeding due to injections and 2) a complicated search for a standardized concentration of the inducer. On the contrary, the local application of 15 mM AA caused severe and reproducible thrombotic and subsequent haemorrhagic events. Hence it was selected as the inducer for thrombosis in the following test series. In contrast, the local application of collagen (1 mg/mL) did not result in thrombotic reactions and was not considered for further experiments *(data not shown)*.

To avoid a direct contact between the test compounds and AA, and to test the systemic effect of the tested compound, intravenous injection 1 hour before the AA application was used. Based on the above mentioned results, two of the most effective compounds were analyzed and compared with ASA. Historical laboratory values showed that either the injection of 0.9% NaCl or the local application of the solvent (ultrapure water) caused almost no toxic reactions on the CAV and it was selected as the negative control. Injection of saline followed by local treatment with AA caused severe thrombotic and haemorrhagic events and was therefore used as the positive control. Haemorrhage was observed very often after thrombosis, and was assumed to be a consequence of the depletion of the haemostatic machinery of the hen's egg that was, in some cases, followed by lethal events. Mortality was confirmed by the cessation of heartbeat.

Without pre-treatment, AA caused lethality in 46% of the eggs after the first hour and 60% after 24 hours. In order to standardize the method, the antithrombotic potential of systemic ASA treatment was firstly tested. Indeed, pre-treatment with ASA decreased the lethality from 46% to 7% after the first hour and from 60% to 27% after 24 hours. These results confirmed the applicability of the model for testing antiplatelet drugs aimed at inhibition of thrombosis. Both 4-MC and pyrogallol were tested under identical conditions as ASA. 4-MC showed a very strong protective potential for developing hen's eggs, without mortality after the first hour, and only 7% lethality after 24 hours, which is comparable with the outcome in the negative control. In the case of pyrogallol, again no mortality was observed after the first hour while 31% of embryos died after 24 hours, which was similar to ASA (Figure 5). In fact, these results indicated that 4-MC is more potent in prevention of lethal thrombotic events than ASA. Pyrogallol was less active than ASA, but improved the survival in comparison with the positive control.

Besides the impact of the pre-treatment on the survival rate of the hen's eggs, more in-depth analysis regarding differences concerning the extent and frequency of thrombosis between ASA and both hydroxybenzenes was performed (Figure 6A). Both tested compounds and ASA showed a significant improvement in the size and intensity of thrombosis as well as a delay in the time of occurrence of thrombosis (Figure 6B) in comparison with the positive control. Notwithstanding the fact that ASA was not the most potent compound in preventing the mortality, it was the most potent inhibitor of thrombosis and its antithrombotic effect was observed earlier and the percentage of samples with thrombosis was the lowest (Figure 6B). These differences are likely

caused by a different mechanism, since ASA blocks the earliest step, the transformation of added AA into prostaglandin H_2.

4 Discussion

The beneficial effects of a flavonoid-rich diet and flavonoids alone are described in many recent studies. Mentioned positive effects include anti-oxidant, anti-cancer, anti-diabetes,[1, 33, 34] as well as other protective effects on the cardiovascular system.[35, 36] Formerly, the cardioprotective effect was considered to be based on the anti-oxidant properties, but currently it seems that there are other mechanisms including vasorelaxant properties and antiplatelet potential which are probably more relevant for the cardioprotective effect.[6, 7, 12, 26, 34, 37] However, studies analysing flavonoid metabolism suggested that parent flavonoids cannot be the major players in their positive effects observed in humans since they reach virtually unmeasurable concentrations in blood.[8] Metabolism in the human body also produces small phenolic compounds, which are absorbed into the systemic circulation at higher concentrations than the parent flavonoids.[15] The final plasma concentrations of these metabolites are obviously dependent on flavonoid intake and nature. Intake of 500 g of berries or 450 ml of cranberry juice resulted in concentrations of some phenolic metabolites, including the sulphates of the tested pyrogallol and 4-MC, as high as 3.5-43 µM.[16, 17] Therefore, it was tempting to test these metabolites for their effects in biologically relevant conditions. There have been a few studies in which only a few metabolites were tested and some antiplatelet effects were observed.[11, 20, 21] Hence, in this study we focused on the available spectrum of known flavonoid metabolites. Twenty-nine commercially available colon metabolites of the most frequent flavonoids were tested. The screening of their activity was highly selective and only four of them, namely 4-MC, phloroglucinol, resorcinol and pyrogallol, were able to decrease the platelet aggregation induced by AA relevantly (Figure 1). A similar study included 26 different low molecular weight phenolic compounds, but most of the tested compounds were, however, components of the diet that are not absorbed in the parent form. Also in that study, only 4 compounds (hippuric acid, resorcinol, pyrogallol and catechol) blocked platelet aggregation triggered by collagen in human PRP. Interestingly, those mentioned 4 active compounds are exceptions since they are also metabolites of polyphenolic compounds. Notwithstanding some information on pyrogallol and resorcinol being published in that study,[21] we have also included them in our study for comparison. In the mentioned study, resorcinol and pyrogallol inhibited at a concentration of 100 µM collagen induced aggregation in PRP by 31 ± 2 % and 9 ± 2 %, respectively. In our study, using whole human blood, resorcinol had practically no effect while pyrogallol demonstrated some mild effect even at a concentration of 10 µM. There are also data on phloroglucinol:[20] it was observed that phloroglucinol suppressed dose-dependently the AA-induced aggregation of rabbit platelets at concentrations of 1-25 µM. In our study with whole human blood, the effect of phloroglucinol on AA-induced aggregation was weaker (Figure 1B), but the activity against

collagen was observed in a similar concentration range (Figure 3A) confirming the antiplatelet potential of the compound. As far as we know, no data on antiplatelet potential of 4-MC have ever been published. There is some information on catechol, the chemical structure of which differs only by the absence of a methyl group. Interestingly, the inhibitory effect of catechol (73 ± 2 %) at 100 µM observed in the study of Ostertag et al.[21] was very similar to our data for 4-MC, since 4-MC blocked at the same concentration the collagen induced aggregation in whole human blood by 64 ± 2 %. The comparable results for catechol and 4-methylcatechol suggest that the methyl group is probably not necessary for the antiplatelet potential, but the hydroxyl groups in positions 1 and 2 are crucial. On the other hand, the effect of catechol disappeared rapidly at the lower concentrations.[21] This observation suggests that the methyl group can increase and stabilise the activity, since 4-MC was still a potent inhibitor even at concentrations below 10 µM. The necessity of this catechol moiety and its stabilisation by the methyl group suggested that possibly either calcium or another metal chelation could interfere in the antiplatelet activity. This was, however, excluded based on our results.

The fact that 4-MC was found to be such a very potent inhibitor of platelet aggregation, even with a better efficacy than the clinically used antiplatelet drug ASA, was rather surprising. 4-MC can also be found in some plants e.g. *Ferula* sp.,[38] but more importantly, it is a human intestinal metabolite of quercetin.[39] Quercetin need not be presented in detail as it is a widely spread flavonoid, which has been demonstrated to possess a lot of positive effects on human health, including antihypertensive,[40] as well as antiplatelet effects.[7, 41] However, quercetin reaches very low concentrations in plasma and moreover, it is mostly present in the form of its different conjugates.[12] For example, controlled polyphenol-rich supplementation results in a human plasma level of total quercetin of about 100 nM,[7] which is markedly less than the achievable plasma concentration of some of its colonic metabolites. In fact, the potential of 4-MC and other quercetin metabolites to decrease arterial blood pressure was also recently described.[19, 42] Another human colon intestinal bacterial metabolite of quercetin[43] and moreover of naringin, hesperidin, poncirin and catechin,[11] is phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene). Phloroglucinol has also been isolated from natural sources; e.g. the brown alga *Ecklonia cava*, which is now a very modern dietary supplement, and *Acacia arabica.*[20] Phloroglucinol has some proven health positive effects; anti-inflammatory, anti-oxidative,[20] and antithrombotic properties[44] were documented and Li et al. [45] suggested that phloroglucinol can protect rat myocardium against ischemia–reperfusion injury. Concerning the mechanism, the results from the only available study were confirmed. Chang et al. [20] reported that phloroglucinol did not act as an antagonist at TXA_2 receptors, but inhibited the activity of ovine COX-1 at concentrations of 10 µM, 25 µM and 50 µM by 45%, 64% and 74%, respectively. Our observed inhibitory effects at these concentrations in the same model were 11 ± 1 %, 35 ± 2% and 61 ± 6%, respectively (Figure 2A). However, in whole blood, a more relevant biological environment, the effect was weaker (Figure 2B). Since we also observed a mild inhibitory effect of phloroglucinol toward thromboxane A_2

synthase, it is possible that inhibition of both enzymatic steps in thromboxane A_2 synthesis can be responsible for the decrease in its synthesis.[20]

Pyrogallol is a metabolite of quercetin, epicatechin and also of some other flavonoids.[11, 15, 43] It can be found in high concentration in the extract of *Stevia rebaudiana*, which is now used as an artificial sweetener. The content of pyrogallol is the highest among all the contained polyphenols (almost 1 g in 100 g)[46] and its presence together with quercetin, could be responsible for the observed antihypertensive effect of *Stevia*.[47]

The effect of 4-MC on AA and collagen induced aggregation was better than that of ASA, the standard and still the most widely used antiplatelet drug. Interestingly, daily administration of 460 mg of ASA in sensitive subjects resulted in plasma concentrations in the range of 2.9 – 33.3 µM.[48] Such concentrations led only to about 50% inhibition of platelet aggregation induced by AA in our assay with ASA (25 µM is our established IC_{50}, Figure 1C) and maximally 40% inhibition of aggregation triggered by collagen (Figure 3A). The observed inhibition effect of 4-MC in this concentration range was approximately 40-77% for AA and roughly 16-59% for collagen. Nevertheless, the observed concentration of pyrogallol and catechol sulphates after metabolism from parent flavonoids was in the range of 5-20 µM.[16, 17] Even in this concentration range, 4-MC was able to inhibit platelet aggregation induced by AA and collagen (Figure 3A) and such data suggest its biologically relevant effect.

Positive effects of 4-MC and pyrogallol were further confirmed in a novel *ex ovo* thrombotic model which mimics the *in vivo* situation (Figures 5 and 6). This shell-less hen's egg model, commonly used for the monitoring of the toxicity of compounds, was adapted and successfully standardized for investigation of the antithrombotic effect of compounds in our laboratory. In contrast to the commonly used HET-CAM assay[49] we used an earlier stage of the development to avoid unspecific reactions of the immune or nervous system.[50] Since the blood of the developing hen's eggs already contains thrombocytes[51] it was possible to induce the thrombosis by local application of AA. Since collagen did not induce thrombotic effects after local application, we suggest that the molecule was not able to diffuse through the membrane of the CAV due to its high molecular weight. In contrast, the small molecule AA showed maximum thrombotic effects 10 minutes after application (Figure 6B). The systemic pre-treatment of the compounds confirmed the results obtained *in vitro* and showed a substance-specific antithrombotic effect of 4-MC and pyrogallol, comparable with the standard treatment with ASA. Therefore, we suggest that the HET-CAV could be an alternative test system to investigate the antithrombotic potential of novel compounds.

The determination of mechanism of action of 4-MC was performed by a series of experiments and was shown that, quite surprisingly, it is not based on inhibition of the mainstream AA-based aggregation cascade. 4-MC did not block COX-1 and did not antagonise thromboxane receptors

while it potently blocked AA and collagen triggered platelet aggregation. The only other player in the AA-based cascade is thromboxane synthase. Indeed, this enzyme was blocked by 4-MC, but only by 30% at a concentration of 100 µM and hence this can hardly be considered as the major mechanism of action. It is supposed that thromboxane A_2 is released from the platelet and stimulates other platelets by binding to its receptor. However, clear data on the release of this highly unstable mediator are not available. We firstly supposed that 4-MC can entrap thromboxane A_2 inside the cells and this could be the basis of its antiplatelet potential. This mechanism was also excluded. Therefore we concentrated on other less possible mechanisms which are different from the effect of ASA. Since AA and collagen are increasing intracellular calcium levels,[52] the potential effect on calcium signalling was investigated. Direct calcium chelation was excluded but, based on our results, 4-MC can interfere with calcium intracellular trafficking and this seemed to be its major mechanism of action.

Study limitations

The authors of this study point out that the results presented here are limited to *ex vivo* and *in vivo*-like models. Although 4-MC was at the molecular level more active than the therapeutically used acetylsalicylic acid, there is currently no definite proof that these effects will also be present in clinical settings, in particular in patients with either cardiovascular diseases or risk factors. Also data on plasma concentrations of tested metabolites from clinical trials are limited and may vary largely from human to human. In addition, clinical studies testing antiplatelet effects of flavonoids are inconclusive.[7, 53] In this study, the blood donors were not instructed to avoid consumption of any specific food and non-alcoholic drinks given the practical impossibility of hindering the intake of polyphenols that are commonly present in most food and drinks. There can hence be apparently huge differences in the intake of polyphenols in the diet. We do not think that this limitation can revert the outcome of our study since a) if the intake of polyphenols and subsequently the plasma levels of metabolites were higher, the effect of metabolites in our *ex vivo* study would be rather underestimated, b) calibration was always performed in order to normalize the inter-individual differences.

In conclusion, we report here for the first time that 4-MC is a very strong inhibitor of platelet aggregation in both *ex vivo* and *in vivo*-like conditions. Hence it is possible that it can be responsible, at least partly, for the antiplatelet effects of orally given flavonoids. To confirm it, proof in an animal model and clinical settings will be necessary. An interesting idea for future research would also be to test combinations of these metabolites alone or with standard antiplatelet drugs acting at different levels of the platelet aggregatory cascade.

This study was supported by EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841) co-funded by ERDF and by the Czech Science Foundation [grant number 17-05409S/P301]. L.A. and M.H. thanks Charles University SVV (260 414). D.F. would like to thank the German Research Foundation (CRC

1278-PolyTarget) for financial support. We would like to thank Prof. Gerald Blunden for critical reading of the manuscript.

P.M. and D.F. designed the experiments, L.A., J.K., K. M., M. H., P.M. and V.T. participated on ex vivo experiments, M.M. performed confocal imaging, L.A. and P.W. performed the ex ovo experiments, L.A., P.W. and D.F. analysed the ex ovo data, and P.M. and L.A. wrote the article. All authors participated in the revision.

The authors declare no conflict of interest.

5 References

[1] K. B. Pandey, S. I. Rizvi, *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2009**, *2*, 270.

[2] M. Gorzynik-Debicka, P. Przychodzen, F. Cappello, A. Kuban-Jankowska, A. Marino Gammazza, N. Knap, M. Wozniak, M. Gorska-Ponikowska, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 686.

[3] J. Mursu, S. Voutilainen, T. Nurmi, T. P. Tuomainen, S. Kurl, J. T. Salonen, *Br. J. Nutr.* **2008**, *100*, 890.

[4] S. O. Keli, M. G. Hertog, E. J. Feskens, D. Kromhout, *Arch. Intern. Med.* **1996**, *156*, 637.

[5] P. C. Elwood, S. Renaud, D. S. Sharp, A. D. Beswick, J. R. Obrien, J. W. G. Yarnell, *Circulation* **1991**, *83*, 38.

[6] L. Applova, J. Karlickova, M. Riha, T. Filipsky, K. Macakova, J. Spilkova, P. Mladenka, *Phytomedicine* **2017**, *35*, 11.

[7] G. P. Hubbard, S. Wolffram, J. A. Lovegrove, J. M. Gibbins, *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, *62*, 469.

[8] T. Walle, *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *36*, 829.

[9] D. M. Gott, L. A. Griffiths, *Xenobiotica* **1987**, *17*, 423.

[10] L. A. Griffiths, A. Barrow, *Biochem. J.* **1972**, *130*, 1161.

[11] D. H. Kim, E. A. Jung, I. S. Sohng, J. A. Han, T. H. Kim, M. J. Han, *Arch. Pharmacal Res.* **1998**, *21*, 17.

[12] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier, *Antioxid. Redox Signaling* **2013**, *18*, 1818.

[13] S. M. Henning, P. Wang, N. Abgaryan, R. Vicinanza, D. M. de Oliveira, Y. Zhang, R. P. Lee, C. L. Carpenter, W. J. Aronson, D. Heber, *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 483.

[14] M. R. Olthof, P. C. Hollman, M. N. Buijsman, J. M. van Amelsvoort, M. B. Katan, *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1806.

[15] A. Crozier, D. Del Rio, M. N. Clifford, *Mol. Aspects Med.* **2010**, *31*, 446.

[16] R. C. Pimpao, M. R. Ventura, R. B. Ferreira, G. Williamson, C. N. Santos, *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, 454.

[17] R. P. Feliciano, A. Boeres, L. Massacessi, G. Istas, M. R. Ventura, C. Nunes Dos Santos, C. Heiss, A. Rodriguez-Mateos, *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *599*, 31.

[18] P. C. Karlsson, U. Huss, A. Jenner, B. Halliwell, L. Bohlin, J. J. Rafter, *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2343.

[19] I. Najmanova, J. Pourova, M. Voprsalova, V. Pilarova, V. Semecky, L. Novakova, P. Mladenka, *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 981.

[20] M. C. Chang, H. H. Chang, C. P. Chan, H. Y. Chou, B. E. Chang, S. Y. Yeung, T. M. Wang, J. H. Jeng, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2012**, *263*, 287.

[21] L. M. Ostertag, N. O'Kennedy, G. W. Horgan, P. A. Kroon, G. G. Duthie, B. de Roos, *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 1624.

[22] O. Toth, A. Calatzis, S. Penz, H. Losonczy, W. Siess, *Thromb. Haemostasis* **2006**, *96*, 781.

[23] Cayman Chemical Company, COX inhibitor Screening Assay kit, https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/560131, Access March 6, 2019

[24] T. S. Chang, H. M. Kim, K. S. Lee, L. Y. Khil, W. C. Mar, C. K. Ryu, C. K. Moon, *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 259.

[25] Cayman Chemical Company, Thromboxane B2 EIA Kit, https://www.caymanchem.com/product/501020, Access March 6, 2019

[26] J. Karlickova, M. Riha, T. Filipsky, K. Macakova, R. Hrdina, P. Mladenka, *Planta Med.* **2016**, *82*, 76.

[27] F. Schlenk, S. Werner, M. Rabel, F. Jacobs, C. Bergemann, J. H. Clement, D. Fischer, *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 3271.

[28] A. Tesch, C. Wenisch, K. H. Herrmann, J. R. Reichenbach, P. Warncke, D. Fischer, F. A. Muller, *Mater. Sci. Eng., C* **2017**, *81*, 422.

[29] V. Hamburger, H. L. Hamilton, *J. Morphol.* **1951**, *88*, 49.

[30] J. A. Rothwell, M. Urpi-Sarda, M. Boto-Ordonez, R. Llorach, A. Farran-Codina, D. K. Barupal, V. Neveu, C. Manach, C. Andres-Lacueva, A. Scalbert, *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 203.

[31] Z. D. Liu, R. C. Hider, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 26.

[32] J. G. White, G. H. Rao, J. M. Gerrard, *Am. J. Pathol.* **1974**, *77*, 135.

[33] T. Cornwell, W. Cohick, I. Raskin, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 995.

[34] P. Mladenka, L. Zatloukalova, T. Filipsky, R. Hrdina, *Free Radical Biol. Med.* **2010**, *49*, 963.

[35] M. Sagara, T. Kanda, N. J. M, T. Teramoto, L. Armitage, N. Birt, C. Birt, Y. Yamori, *J. Am. Coll. Nutr.* **2004**, *23*, 85.

[36] G. Williamson, C. Manach, *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 243S.

[37] L. Hooper, P. A. Kroon, E. B. Rimm, J. S. Cohn, I. Harvey, K. A. Le Cornu, J. J. Ryder, W. L. Hall, A. Cassidy, *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 38.

[38] M. Erat, H. Sakiroglu, O. I. Kufrevioglu, *Food Chem.* **2006**, *95*, 503.

[39] H. Schneider, A. Schwiertz, M. D. Collins, M. Blaut, *Arch. Microbiol.* **1999**, *171*, 81.

[40] S. Chirumbolo, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2012**, *90*, 1652.

[41] J. A. Guerrero, L. Navarro-Nunez, M. L. Lozano, C. Martinez, V. Vicente, J. M. Gibbins, J. Rivera, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2007**, *64*, 133.

[42] J. Pourova, I. Najmanova, M. Voprsalova, T. Migkos, V. Pilarova, L. Applova, L. Novakova, P. Mladenka, *Vasc. Pharmacol.* **2018**, *111*, 36.

[43] H. Schneider, A. Schwiertz, M. D. Collins, M. Blaut, *Arch. Microbiol.* **1999**, *171, 81*.

[44] J. S. Bae, *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 1572.

[45] T. T. Li, Y. S. Zhang, L. He, N. S. Li, J. Peng, Y. J. Li, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2011**, *38*, 27.

[46] I. S. Kim, M. Yang, O. H. Lee, S. N. Kang, *Lwt-Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1328.

[47] S. De, S. Mondal, S. Banerjee, *Stevioside: Technology, Applications and Health*, Wiley-Blackwell **2013**.

[48] B. Dahlen, L. O. Boreus, P. Anderson, R. Andersson, O. Zetterstrom, *Allergy* **1994**, *49*, 43.

[49] N. P. Luepke, *Food Chem. Toxicol.* **1985**, *23*, 287.

[50] M. Rosenbruch, *Altex* **1994**, *11*, 199.

[51] Y. Tahara, S. Omori, A. Hashimoto, *Dev., Growth Differ.* **1983**, *25*, 75.

[52] G. Hsiao, F. N. Ko, T. T. Jong, C. M. Teng, *Biol. Pharm. Bull.* **1998**, *21*, 688.

[53] C. Faggio, A. Sureda, S. Morabito, A. Sanches-Silva, A. Mocan, S. F. Nabavi, S. M. Nabavi, *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, *807*, 91.

Legend to the figures

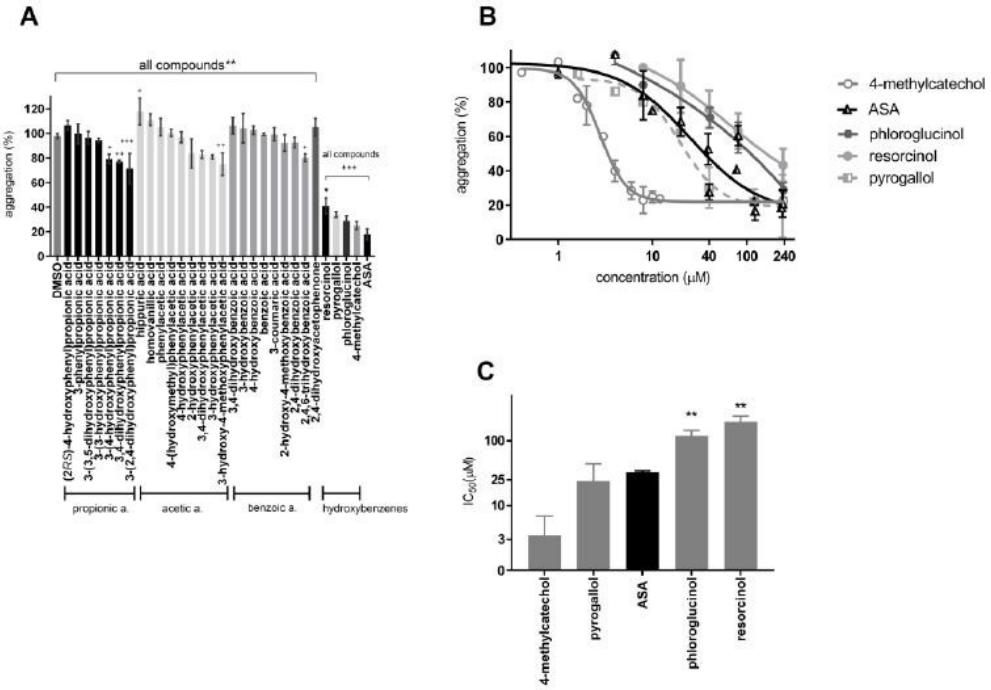


Figure 1. *Effects of flavonoid metabolites on whole blood platelet aggregation induced by AA.* ***A****: Comparison of the antiplatelet effect of all tested compounds at a final concentration of 240 µM.* ***B****: Concentration-response curves of the most active metabolites and ASA. Each active compound was tested at least with three different blood samples (in the case of 4-MC, blood samples from 6 donors were used) and each point represents at least two independent measurements.* ***C****: IC_{50} of tested metabolites and the standard (ASA). Statistical significance: comparison vs. the positive standard ASA is shown with asterisk: * p > 0.01; while vs. negative blank (the solvent DMSO) with cross: $^{+}p > 0.05$; $^{++}p > 0.01$; $^{+++}p > 0.001$.*

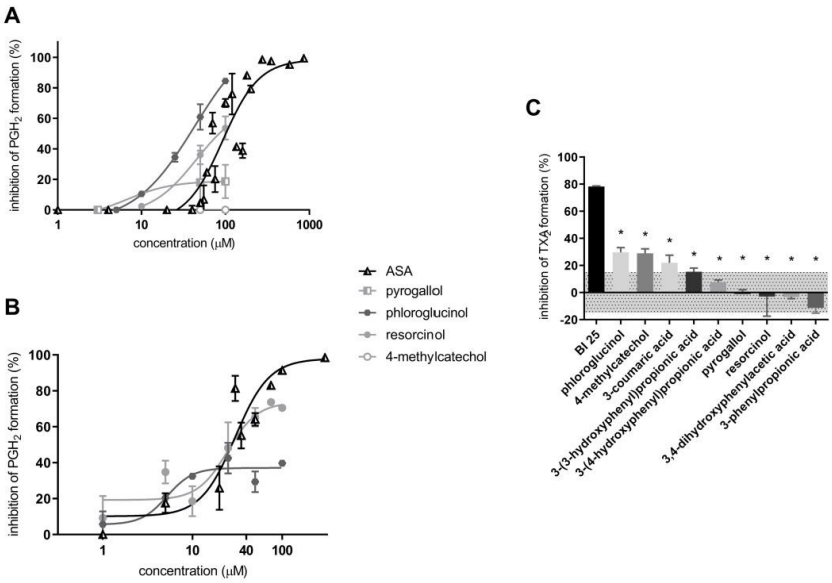


Figure 2. *Effects of tested compounds on cyclooxygenase-1 and thromboxane A_2 synthase.* ***A:*** *Concentration-response curves of tested compounds and ASA on inhibition of recombinant ovine COX-1.* ***B:*** *inhibition of platelet COX-1 in human platelet rich plasma. Each compound was tested with at least two different blood samples and each point represents at least two independent measurements.* ***C:*** *Effects of selected metabolites and 1-benzyimidazole on thromboxane A_2 synthase. Compounds were tested at a concentration of 100 µM. 1-Benzylimidazole at a concentration of 25 µM (BI 25) is shown for comparison as a standard. For an easier overview, the grey area in part C indicates the error of the method, hence all data in this area are not significantly different from the solvent. *p > 0.001 vs. 1-benzylimidazole.*

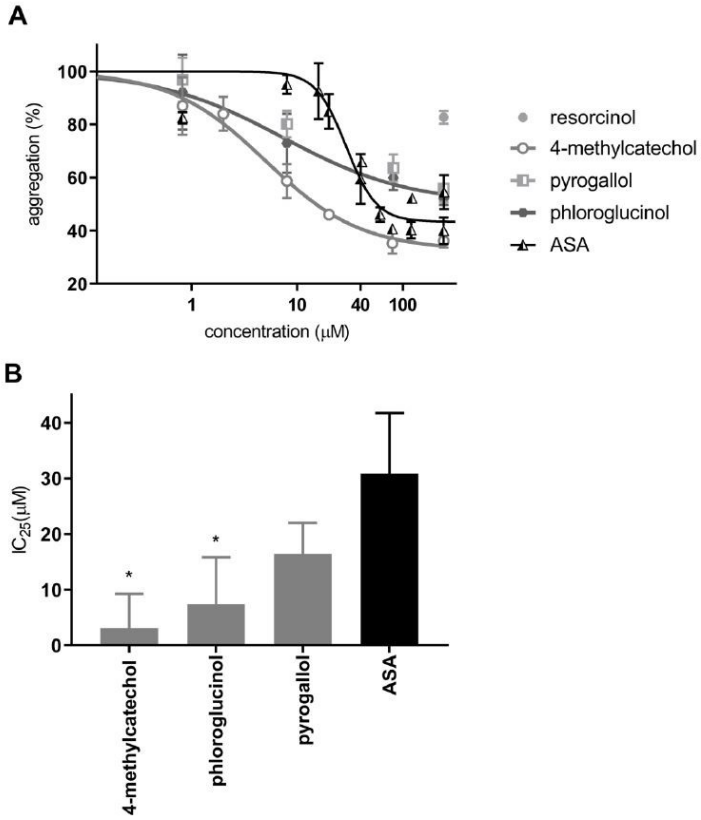


Figure 3. *Effects of tested compounds on platelet aggregation in whole human blood induced by collagen.* ***A****: Concentration-response curves of tested metabolites. Each active compound was tested with at least two different blood samples and each point represents minimally 2 independent measurements.* ***B****: IC_{25} of tested metabolites and standard (ASA). *p > 0.01 vs ASA.*

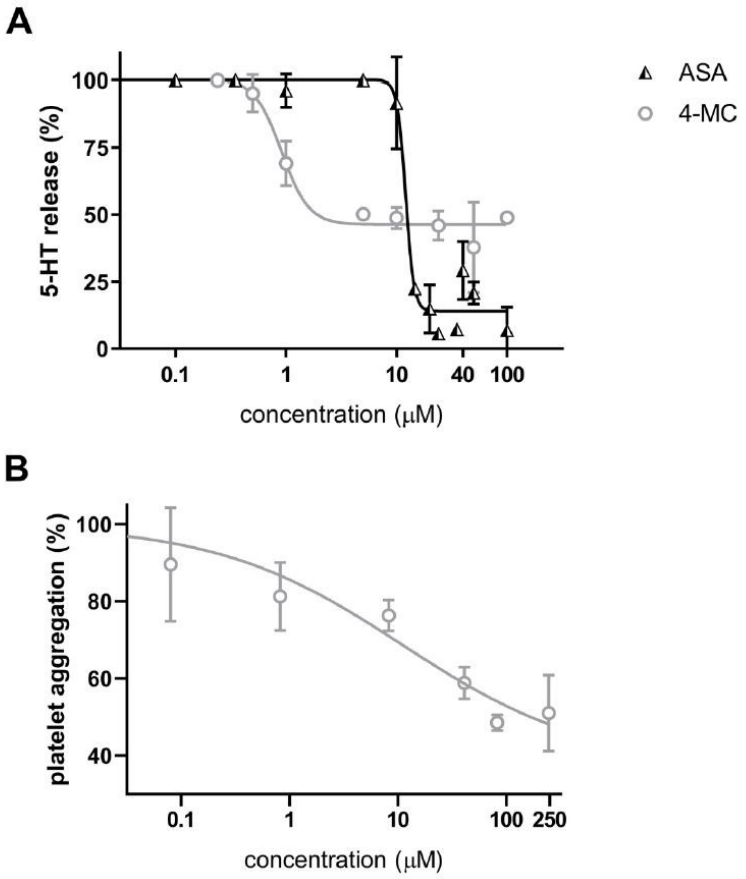


Figure 4. *The effect of 4-methylcatechol on arachidonic acid-based release of serotonin (**A**) and platelet aggregation induced by calcium ionophore A23187 (**B**). For these experiments, blood of 9 different donors was used and each point represents at least 2 independent measurements.*

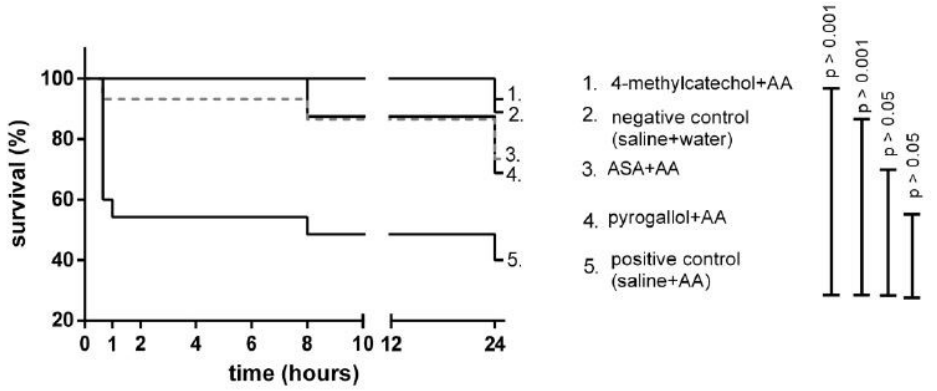


Figure 5. *Kaplan-Meier survival curves of ASA, 4-methylcatechol and pyrogallol on HET-CAV model. Positive control represents i.v. saline, the solvent for the tested compounds, followed by local administration of AA. Saline was applied i.v. in the negative control together with local administration of ultrapure water. Each compound was tested in 15 independent samples.*

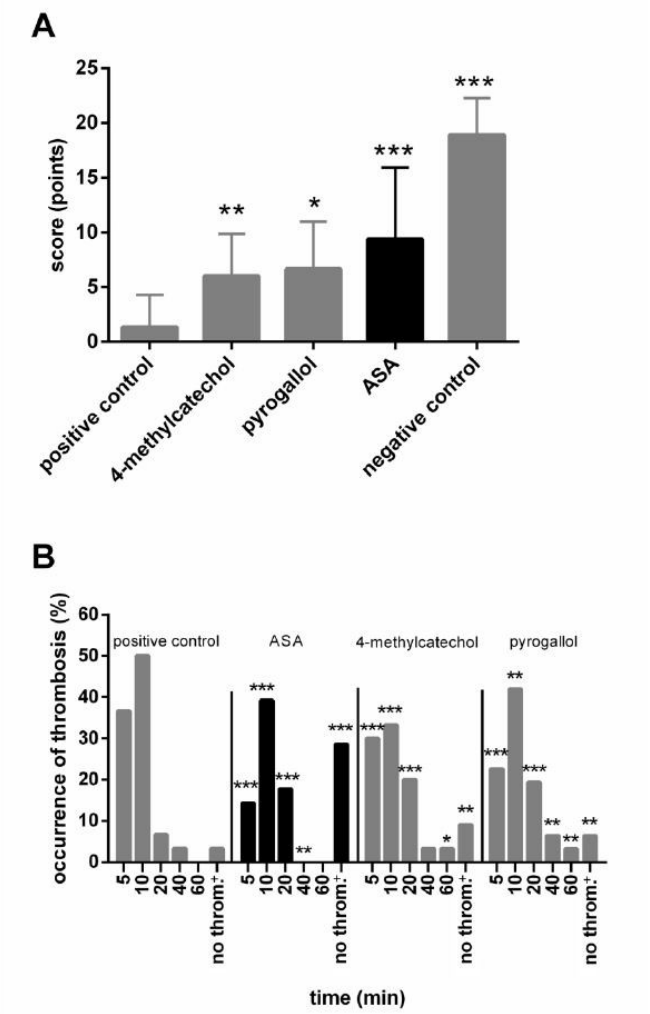


Figure 6. *HET-CAV model.* ***A****: Blind evaluation of composite parameter of thrombosis size and intensity in HET-CAV model by 3 independent observers.* ***B****: Percentage of thrombosis occurrence in HET-CAV model with time. The positive control represents i.v. saline, the solvent for the tested compounds, followed by local administration of AA. * p > 0.05; ** p > 0.01; *** p > 0.001 vs. positive control (AA).*