

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Hradec Králové 2017

Nikola Kopková

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Protidestičkové účinky flavonoidů

diplomová práce

Vedúci diplomové práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2017

Nikola Kopková

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu“.

Dátum:

.....

podpis

Pod'akovanie

Moje pod'akovanie patrí doc. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D., ktorý ma trpezlivo viedol pri spracovávaní diplomovej práce, som mu vd'áchná za metodické vedenie a cenné rady, ústretovosť a láskavosť.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student: Nikola Kopková

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

Název diplomové práce: Protidoštičkové účinky flavonoidů

Najviac zastúpené antioxidanty v bežnej potrave sú flavonoidy. Vykazujú antioxidačné a antiagregačné účinky a iné pozitívne pôsobia na kardiovaskulárne ochorenia. Flavonoidy sú sľubnými kandidátmi byť protidoštičkové lieky. Hoci niekoľko mechanizmov zodpovedných za protidoštičkový účinok bolo zverejnených len niekoľko bolo doložených publikovanými štúdiami. Inhibícia agregácie krvných doštičiek flavonoidmi je reverzibilná, čo je ďalším dôležitým faktorom. Údaje o agregáciach vyvolané trombínom sú kontroverzné, niektorí tvrdia, že flavonoidy nemajú žiaden účinok, iní, že majú pozitívne účinky. (U kvercetinu a genisteinu bola tiež pozorovaná inhibícia agregácie navodená thrombinom). Vplyv na kyselinu arachidonovú v agregáčnej kaskáde je dobre zdokumentované, ale existuje niekoľko nezrovnalostí vyplývajúce z použitia rôznych materiálov. Ďalšie mediátory agregácie sú fosfolipáza A₂, ktorá hrá kľúčovú úlohu v tvorbe zápalových mediátorov. V tomto prípade bolo ukázané, že hlavne genistein je schopný inhibovať jak fosfolipázu A₂ tak agregáciu navodenú kyselinou arachidonovou. Podľa dostupných štúdií je vplyv flavonoidov na COX reverzibilný, zatiaľ čo thromboxan syntázu nie sú schopné prakticky vôbec inhibovať. Ako veľmi dôležité sa javí antagonistické pôsobenie na thromboxanový receptor. Vyššie spomínané mechanizmy naznačujú, že by flavonoidy mohli inhibovať aj agregáciu navodenú kolagénom a to skutočne niektoré štúdie potvrdili. Niektoré flavonoidy môžu i v nízkych koncentráciách znížiť agregáciu krvných doštičiek indukovanú ADP.

Na záver možno povedať, že aj preto, že existuje celá rada štúdií popisujúcich antiagregačné účinky flavonoidov, zatiaľ neexistujú jednoznačné dôkazy z humánných štúdií o ich prospešnosti.

Kľúčové slová: flavonoidy, krvné doštičky, protidoštičkový účinok, kolagén, ADP, COX, fosfolipáza A₂, antioxidačný účinok

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Nikola Kopková

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

Title of diploma thesis: Antiplatelet effects of flavonoids

The most common antioxidants in ordinary food are flavonoids. They show antioxidant and anti-aggregation effects and other positive effects on cardiovascular diseases. Flavonoids are promising candidates to be antiplatelet drugs. Although several mechanisms responsible for antiplatelet activity have been suggested, only a few have been documented by published studies. The inhibition of blood platelet aggregation by flavonoids is reversible, which is another important factor. Data on thrombin-induced aggregation are controversial, some claim that flavonoids have no effect, the others say they have positive effects. (In the case of quercetin and genistein, inhibition of aggregation induced by thrombin was documented). The effect on arachidonic acid in the aggregation cascade is well documented, but there are several inconsistencies resulting from the use of different materials. Other mediators of aggregation are phospholipase A₂, which plays a key role in the formation of inflammatory mediators. In this case, it has been shown that mainly genistein is capable of inhibiting both phospholipase A₂ and aggregation induced by arachidonic acid. According to available studies, the effect of flavonoids on COX is reversible, whereas the effect on thromboxane synthase is practically absent. An antagonistic effect on the thromboxane receptor appears to be very important. The above-mentioned mechanisms suggest that flavonoids could also inhibit collagen-induced aggregation, and indeed some studies have confirmed that. Some flavonoids may reduce platelet aggregation induced by ADP at low concentrations.

Finally, it can be said, even though there are a number of studies describing the anti-aggregation effects of flavonoids, there is not yet unambiguous evidence from human studies about their benefits.

Key words: flavonoids, blood platelet, antiaggregation, collagen, ADP, COX, phospholipase A₂, antioxidant effect

OBSAH

1 Úvod	9
2 Sekundárne metabolity rastlín	10
2.1 Flavonoidy	11
2.2 Príklady flavonoidov	17
3 Krvné doštičky	22
4 Antiagregačné účinky flavonoidov	29
4.1 Agregácia navodená kolagénom	29
4.2 Agregácia navodená kyselinou arachidonovou	34
4.3 Vplyv na fosfolipázu	35
4.4 Vplyv na COX	42
4.5 Vplyv na Tx-syntázu	46
4.6 Vplyv na Tx-syntázu / COX	47
4.7 Vplyv na Tx- receptory	48
4.8 Agregácia iniciovaná ADP	53
4.9 Agregácia iniciovaná trombínom	58
4.10 Agregácia iniciovaná adrenalínom	60
5 Antioxidačné účinky flavonoidov	61
6 Diskusia	66
7 Záver	67
8 Zoznam použitej literatúry	68

Zoznam skratiek

AA- kyselina arachidonová (arachidonic acid)

ADP - adenzíndifosfát

ASA – kyselina acetylsalicylová (acetylsalicylic acid)

ATP – adenzíntрифосфát

cAMP – cyklický adenzín monofosfát

COX - cyklooxygenáza

DMSO- dimetylsulfoxid

EACA- kyselina ϵ -aminokapronová

EDTA- kyselina etyléndiamíntetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid)

GIT – gastrointestinálny trakt

HUAVEC- ľudské endotelové bunky

IgE- imunoglobulin E

iNOS- indukovaná syntáza oxidu dusnatého

INR - medzinárodný normalizovaný pomer (International Normalised Ratio)

LOX- lipoxygenáza

LPS- lipopolysacharid

NADPH- nikotínadenínindinukleotidfosfát

NSAID – nesteroidné antiflogistiká

PAMBA - kyselina p-aminomethylbenzoová (p-aminomethyl benzoic acid)

PAR- proteázou aktivované receptory

PGE₁- prostaglandín E₁

PGI₂ – prostacyklin (prostaglandín I₂)

PLA₂- fosfolipáza A₂

PRP – plazma bohatá na krvé doštičky (platelet rich plasma)

ROS- reaktívne formy kyslíka (reactive oxygen species)

sPLA₂ – sekrečná fosfolipáza A₂ (secretory phospholipase A₂)

tPA - tkaninový aktivátor plazminogénu

TXA₂ – tromboxan A

U-46619- stabilný analóg prostaglandínu H₂

1 Úvod

Flavonoidy sú prírodné produkty široko rozšírené v rastlinnej ríši a v súčasnej dobe konzumované vo veľkom množstve v dennej strave. Počas posledných dvoch desaťročí, diétne polyfenoly boli ohniskom intenzívneho výskumu v súvislosti s prevenciou a liečbou niekoľkých chorôb súvisiace s oxidačným stresom a zápalovými reakciami. Najprv priaznivé účinky polyfenolov boli pridelené výhradne ich antioxidantným vlastnostiam. V nedávnej dobe, boli skúmané alternatívne cesty a stále viac dôkazov silne podporuje, že zdravotné prínosy flavonoidov sú v zásade sprostredkované ich schopnosťou modulovať kľúčové signálne kaskády a génové transkripcie (Nunez et al. 2017). Flavonoidy sú rozdelené do kategórií podľa ich molekulárnych štruktúr a to: flavonoly, flavóny, flavanony, izoflavóny, antokyany a chalkóny.

Krvné doštičky sú hlavné komponenty ľudskej krvi zodpovedné za rýchlu koaguláciu krvi počas nehody. Na druhú stranu nadmerná agregácia krvných doštičiek je spájaná s chorobami kardiovaskulárneho systému, najmä s rizikom závažných alebo až fatálnych ischemických chorôb srdca. Takéto lieky, ktoré blokujú syntézu tromboxanu, alebo ktoré pôsobia ako antagonisti na tromboxanových receptoroch by mohli obohatiť paletu klinicky užívaných liekov v budúcnosti.

Práca je rozdelená do piatich kapitol. V práci sme sa venovali najprv metabolizmu, akým vznikajú sekundárne metabolity ku ktorým patria aj flavonoidy, a ich deleniu podľa chemickej štruktúry. V ďalšej časti sme rozoberali krvné doštičky ich fyziológiu a lieky, ktoré sa používajú v súčasnej dobe. Od štvrtej kapitoly sme sa venovali antiagregačným účinkom flavonoidov, ktoré sú rozdelené podľa typu induktora, ktorého ovplyvňujú, t.j. kolagén, AA, fosfolipáza A₂, COX, Tx, Tx-receptor, ADP, trombín adrenalín.

2 Sekundárne metabolity rastlín

Bunky živých organizmov sú schopné syntetizovať organické látky, z ktorých sa viacero z nich používa ako prírodné liečivá z dôvodu ich biologickej aktivity. Fotosyntéza je základným biochemickým procesom, v ktorom živé rastliny využívajú slnečnú energiu pre vznik organických látok z oxidu uhličitého a vody. Výsledkom tohto procesu sú sacharidy, z ktorých ďalšími reakciami vznikajú jednoduché nízkomolekulové látky. Tieto látky označujeme ako primárne metabolity, ktoré tvoria východiskový materiál pre špecifické, geneticky zakódované reakcie, pri ktorých vzniká množstvo ďalších látok. Tie charakterizujú sekundárny metabolizmus a označujú sa ako sekundárne metabolity (Tomko et al.1999).

Metabolizmus môžeme charakterizovať ako súbor všetkých chemických reakcií, ktoré prebiehajú v organizme a slúžia k získaniu energie a tvorbe látok potrebných pre jeho činnosť. Primárny metabolizmus organizmu označujeme ako súhrn vzájomných vzťahov enzýmovo-katalyzovaných reakcií, ktoré poskytujú organizmu energiu, biosynetické medziprodukty a kľúčové makromolekuly napríklad DNA, proteíny. Má základný význam pre existenciu živej hmoty.

Primárny metabolizmus je základom každého živého organizmu, sekundárny metabolizmus je špecifický pre nižšie formy života (druhy a kmene). Keďže sekundárne metabolity sú odvodené od medziproduktov primárneho metabolizmu, často môžu poskytovať niektoré informácie o primárnom metabolizme a veľakrát sa stávajú základom pre tvorbu sekundárnych metabolitov (Campbell, 1985).

Táto biosyntéza si vyžaduje prísun energie, väčšinou vo forme ATP z primárneho metabolizmu. Niektoré sekundárne metabolity vznikajú biosynetickými dráhami, ktoré sú podobné dráham primárneho metabolizmu a enzýmy, ktoré katalyzujú ich tvorbu vznikajú tým istý spôsobom ako enzýmy primárneho metabolizmu. Ak vznik a aktivita enzýmov primárneho metabolizmu podlieha rôznym regulačným mechanizmom, môžeme predpokladať, že podobné mechanizmy sa budú uplatňovať aj pri tvorbe a aktivite enzýmov pri vzniku sekundárnych metabolitov. Ak niektorý medziprodukt primárneho metabolizmu slúži aj ako východisková látka na syntézu sekundárnych metabolitov, musí aj jeho proces podliehať regulácií (Pavlovičová, 1998). Charakteristika primárneho a sekundárneho metabolizmu je v Tab. 1.

Tabuľka 1 Rozdiely medzi primárnym a sekundárnym metabolizmom

Metabolizmus	
<u>Primárny</u>	<u>Sekundárny</u>
Potrebný pre rast	Nepotrebný pre rast
Fyziologická úloha známa	Fyziologická úloha neznáma
Prítomnosť za rôznych rastových podmienok	Prítomnosť závislá od rastových podmienok
Prítomný vo všetkých organizmoch	Nie je prítomný všade
Sú tvorené samostatné definované produkty	Často je tvorená zmes príbuzných produktov
Väčšinou produkty s relatívne jednoduchou štruktúrou	Väčšinou produkty s komplexnou chemickou štruktúrou

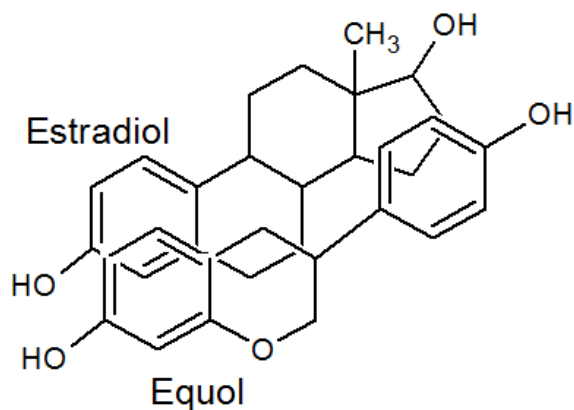
Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Pavlovičová, 1998

2.1 Flavonoidy

Flavonoidy patria do skupiny sekundárných metabolitov a patria tam všetky polyfenolové zlúčeniny so zabudovaným chromónovým skeletom a jeho obmeny. V hlavných podskupinách je zahrnutých viac ako 4000 zlúčenín. Flavonoidy preto patria k najrozšírenejším rastlinným sekundárnym metabolitom (Nagy et al. 2011).

Flavonoly vyskytujúce sa v potravinách a medzi hlavných predstaviteľov patrí kvercetin a kempferol. Sú zvyčajne prítomné v nízkych koncentráciách (15-30 mg/ kg). Najbohatšie zdroje sú cibuľa, kel, pór, čučoriedka a brokolica. Červené víno a čaj môže obsahovať až 45 mg/l flavonoidov. Ovocie často obsahuje 5 až 10 rôznych flavonoidných glykozidov. Tieto flavonoidy sa hromadia vo vonkajších tkanivách pretože ich biosyntéza je stimulovaná svetlom. Existujú značné rozdiely medzi kúskami ovocia z rovnakého stromu a dokonca aj medzi jednotlivými stranami jedného kusu ovocia, v závislosti od slnečného žiarenia. Podobne v listovej zelenine ako je hlávkový šalát či kapusta. V cherry paradajkách je vyšší obsah flavonoidov ako v štandardných paradajkách, pretože majú rozdielne podiely kože.

Prírodné flavóny sa skladajú predovšetkým z glykozidov luteolín a apigenin. Izoflavóny sú flavonoidy so štrukturálnymi podobnosťami s estrogénmi (Obr. 1). Aj keď nie sú steroidy niektoré majú hydroxylové skupiny v polohách 7 a 4 v analogických konfiguráciách ako hydroxylové skupiny v molekule estradiolu. Vďaka tomu sa môžu viazať na estrogénové receptory a sú preto klasifikované ako fytosteróny. Izoflavóny sa nachádzajú takmer výlučne v strukovinách (Manach et al. 2004).

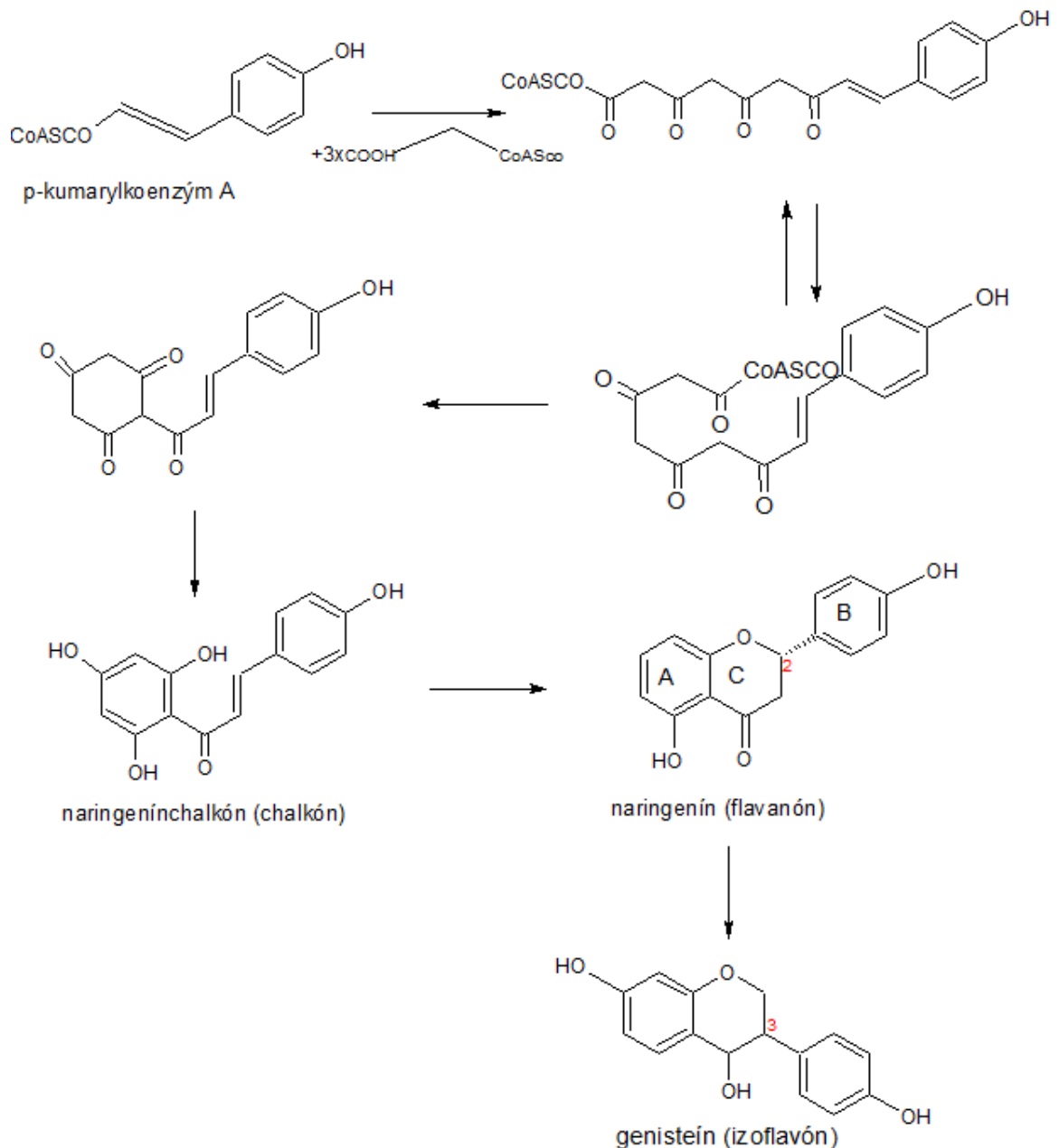


Obrázok 1 Chemická štruktúra equolu a estradiolu

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-nutrition/soy-as-a-functional-food>

Pri biosyntéze flavonoidov dochádza k zmene reagujúcich uhlíkov v molekule medziproduktu. Zmena nastáva v C-2 a C-7, kde namiesto nich sú uhlíky C-1 a C-6. Vede najprv k vzniku chalkónu, ktorý je stereošpecifickým enzýmom cyklizovaný na ľavotočivý flavanón. Po prvýkrát sa tu objavuje základný chrománový skelet. Aromatický kruh tvorený z malonátových jednotiek sa označuje ako A-kruh. Aromatický kruh, ktorý vznikol zo šikimátovej cesty je B-kruh a C-kruh vznikol cyklizáciou chalkónu γ -pyrán. Pôsobením špecifickej izomerázy sa môže B-kruh premiestniť z uhlíka C-2 na C-3 za vzniku izoflavónu (Obr. 2) (Nagy et al. 2011).

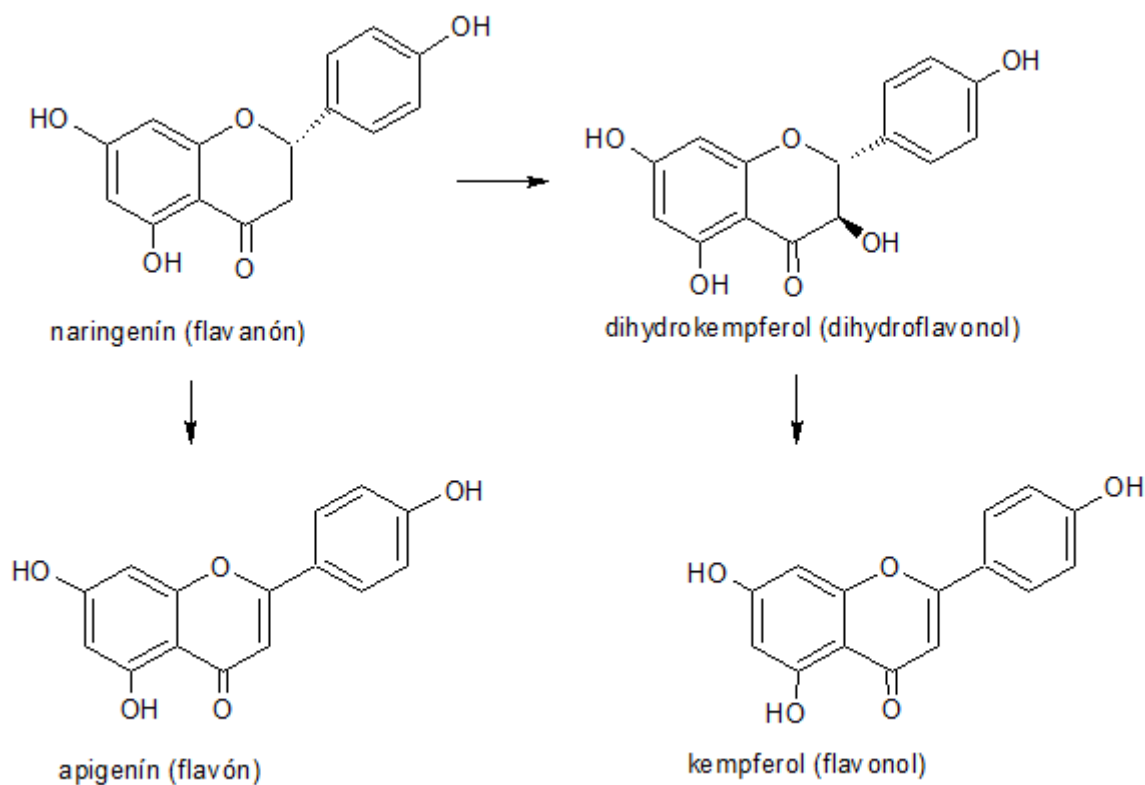
Flavonoidy, ktoré zdieľajú spoločnú štruktúru skladajúcu sa z dvoch aromatických kruhov (A a B), ktoré sú spolu spojené až tromi atómami uhlíka, ktoré tvoria heterocykly (kruh C), môžu byť samy o sebe rozdelené do 6 podtried v závislosti od typu heterocyklu delíme na : flavonoly, flavóny, izoflavóny, flavanony, anthokyany, flavanoly (katechíny a proanthokyanidy).



Obrázok 2 Biosyntéza flavanónu a izoflavanónu

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa Nagy et al. 2011

Ak má rastlina dostatočné enzýmatické vybavenie môžu z flavanónov vzniknúť ďalšie tri rôzne základné štruktúry: flavón, dihydroflavonol, z ktorého vzniká flavonol (Obr. 3). Tieto základné štruktúry aglykónov sa v ďalších stupňoch biosyntézy modifikuje hydroxyláciou A alebo B kruhu a voľné hydroxylové skupiny sú metoxylované alebo glykozilované. D-glukóza, D-galaktóza, L-ramnóza a L-arabínóza sú najčastejšími cukernými zložkami (Obr. 3) (Nagy et al. 2011).

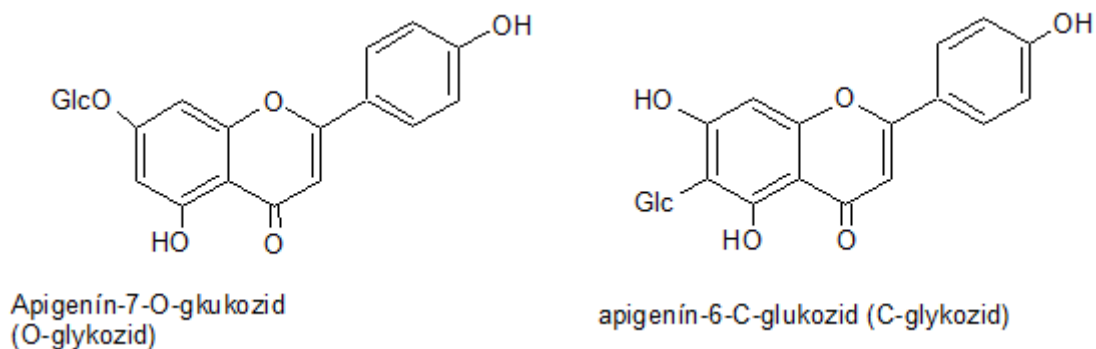


Obrázok 3 Biosyntéza flavónu, dihydroflavonolu a flavonolu

Zdroj: vlastné spracovanie podľa Nagy et al. 2011

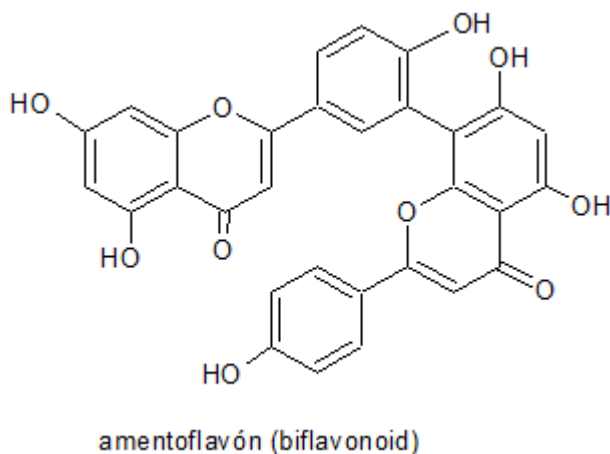
Vo väčšine flavonoidných glykozidov je sacharid viazaný cez hydroxylovú skupinu, menej časté sú C-glykozidy (viď. Obr. 4). Medzi najrozšírenejšie patria monoglykozidy, diglykozidy a triglykozidy. Najviac glykozidov je odvodených od aglykónov flavónu a flavonolu. Počet izoflavonových glykozidov je oveľa menší. Presné rozdelenie flavonoidov bude pojednávané v ďalšej časti.

Biflavonoidy vznikajú oxidatívnou dimerizáciou flavónov alebo flavonolov cez uhlíky v rôznych polohách ľubovoľných kruhov. Podobne vznikajú až hexaflavonoidy. Tieto molekuly nie sú v rastlinnej ríši neobvyklé, ale ich obsah nepresahuje viac ako 1%. V kvete ľubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum*), alebo v listoch ginka dvojľaločného (*Ginkgo biloba*) sa nachádza najznámejší zástupca biapigenínový derivát amentoflavón (Obr. 5) (Nagy et al. 2011).



Obrázok 4 7-O glykozid a 6-C-glykozid (apigenínu)

Zdroj: vlastné spracovanie podľa Nagy et al. 2011

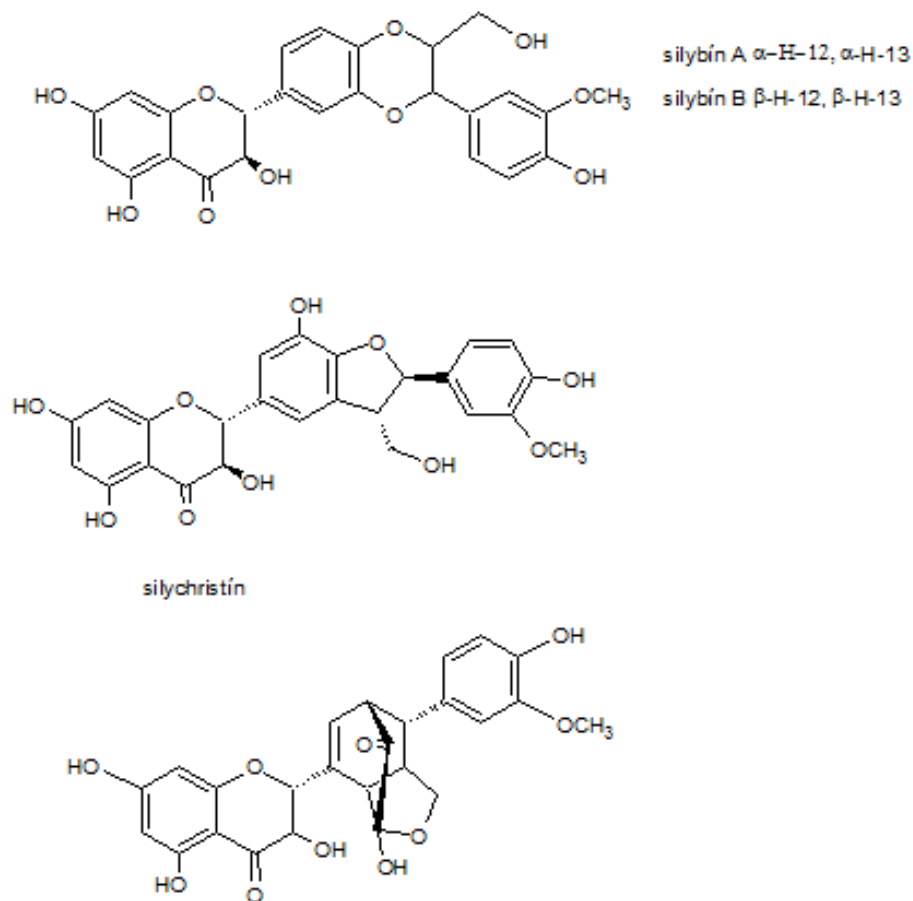


Obrázok 5 Amentoflavón (biflavonoid)

Zdroj: vlastné spracovanie podľa Nagy et al. 2011

Flavonolignány sa nachádzajú v plode pestreca marianského (*Sylibum marianum*). Tvoria zmes viacerých diastereoizomérov štyroch izomérnych zlúčenín. Vznikajú oxidatívnym radikálovým spojením koniferylalkoholu s molekulou taxifolínu za vzniku troch základných typov (Obr. 6):

- 1,4- benzodioxánový typ (silybín, izosilybín),
- benzoxolánový typ (silychristín),
- modifikovaný benzoxolánový typ (silydianín).



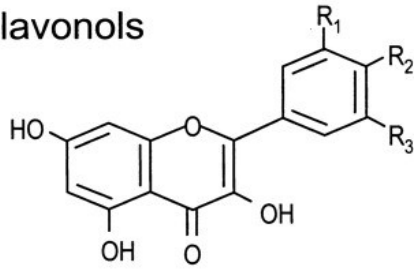
Obrázok 6 Flavonolignány zo *Silybum marianum* (L.) GAERTIN

Zdroj: vlastné spracovanie podľa Nagy et al. 2011

Niekoľko tisíc molekúl, ktoré majú štruktúru polyfenolov (t.j. niekoľko hydroxylových skupín na aromatických kruhoch) boli zistené vo vyšších rastlinách a niekoľko nich sa nachádza v jedlých rastlinách. Tieto molekuly sú sekundárne metabolity rastlín a všeobecne sa podieľajú na obrane proti ultrafialovému žiareniu. Tieto zlúčeniny môžu byť rozdelené do viacerých skupín v závislosti od počtu fenolových kruhov a štruktúrne prvky, ktoré sa viažu na tieto kruhy. Chemické štruktúry flavonoidov a príklady flavonoidov sú znázornené v nasledujúcej kapitole Obr. 7.

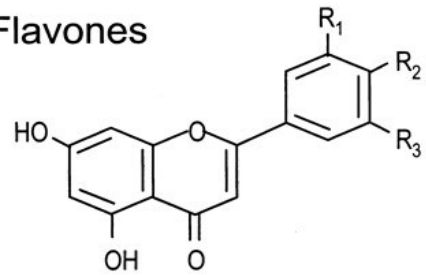
2.2 Příklady flavonoidov

Flavonols



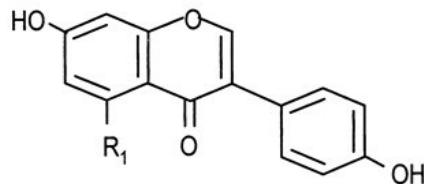
$R_2 = OH; R_1 = R_3 = H$: Kaempferol
 $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Quercetin
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Myricetin

Flavones



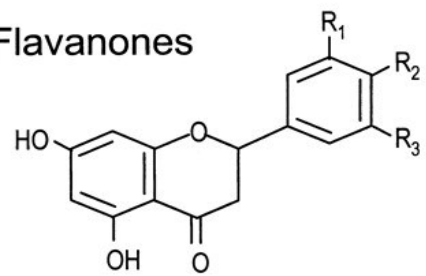
$R_1 = H; R_2 = OH$: Apigenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Luteolin

Isoflavones



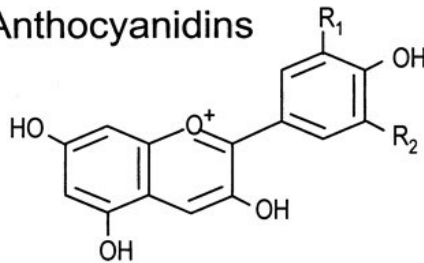
$R_1 = H$: Daidzein
 $R_1 = OH$: Genistein

Flavanones



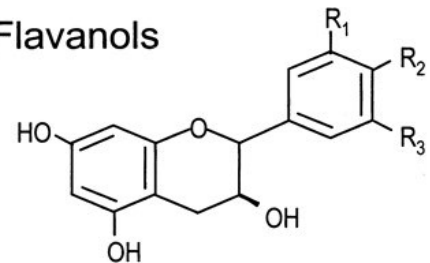
$R_1 = H; R_2 = OH$: Naringenin
 $R_1 = R_2 = OH$: Eriodictyol
 $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$: Hesperetin

Anthocyanidins

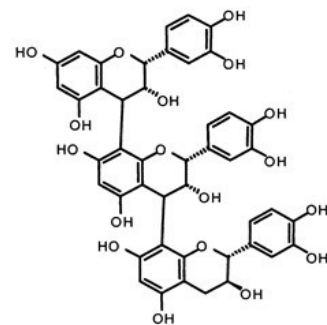


$R_1 = R_2 = H$: Pelargonidin
 $R_1 = OH; R_2 = H$: Cyanidin
 $R_1 = R_2 = OH$: Delphinidin
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$: Petunidin
 $R_1 = R_2 = OCH_3$: Malvidin

Flavanols



$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$: Catechins
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallic acid

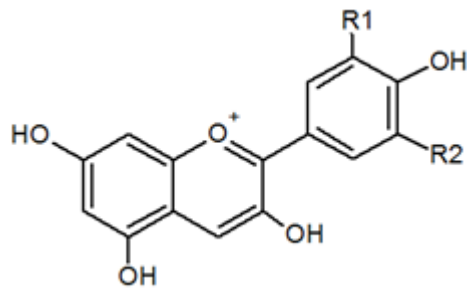


Trimeric procyanidin

Obrázok 7 Chemická štruktúra flavonoidov

Zdroj: Manach et al. 2004

Anthokyany a anthokyanidiny



Obrázok 8 Základný skelet anthkyandinov

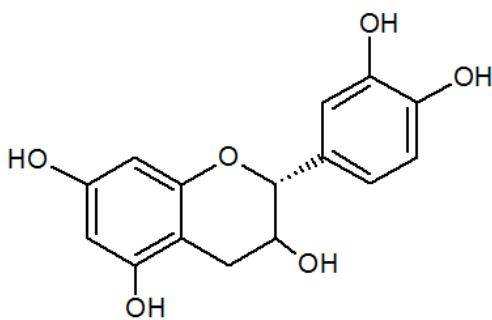
Zdroj: vlastné spracovanie

Tabuľka 2 Prehľad anthokyanidinov

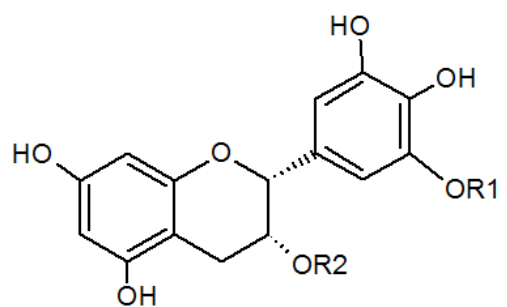
Anthokyanidin	R1	R2
Pelargonidin	H	H
Kyanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Zdroj: vlastné spracovanie

Flavanoly (katechiny)



(+)-katechiny



(-)-epikatechiny

Obrázok 9 Chemické štruktúry katechínov

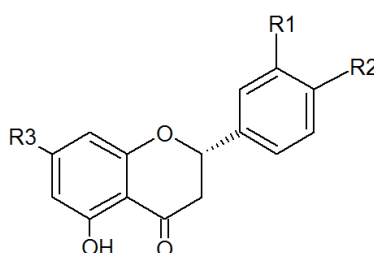
Zdroj: vlastné spracovanie

Tabuľka 3 Prehľad katechinov

		R1	R2
(+)-katechin	(-)-epikatechin (EC)	H	H
(+)-gallokatechin	(-)-epigallokatechin (EGC)	OH	H
	(-)-epikatechin-3-gallát (ECG)	H	Gall
	(-)-epigallogatechin-3-gallát (EGCG)	OH	Gall

Zdroj: vlastné spracovanie

Flavanony



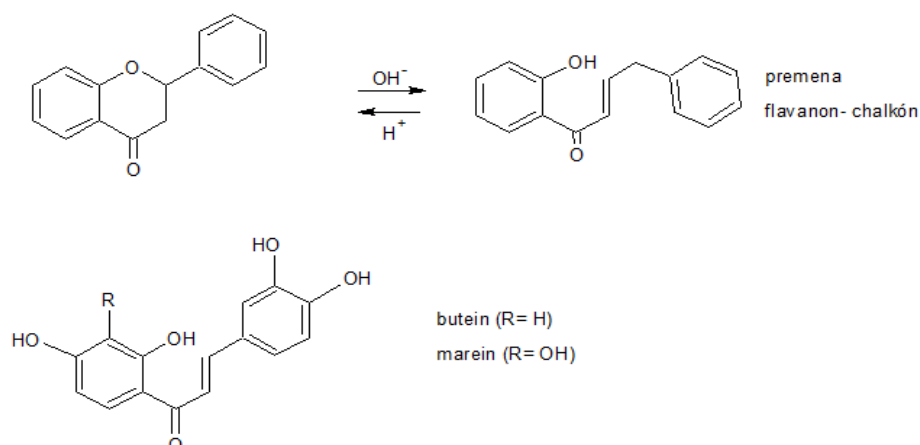
Obrázok 10 Základný skelet flavanonov

Zdroj: vlastné spracovanie

Tabuľka 4 Prehľad flavanonov

Zlúčenina	R1	R2	R3
Didymin	H	OCH ₃	ORut
Eriocitrin	OH	OH	ORut
Eridiktyol	OH	OH	OH
Hesperetin	OH	OCH ₃	OH
Hesperidin	OH	OCH ₃	ORut
Isosakuranetin	H	OCH ₃	OH
Naringenin	H	OH	OH
Naringin	H	OH	ONeo
Narirutin	H	OH	ORut
Neoeriocitrin	OH	OH	ONeo
Neohesperidin	OH	OCH ₃	ONeo
Pinocembrin	H	H	OH
Poncirin	H	OCH ₃	ONeo
Prunin	H	OH	OGlc

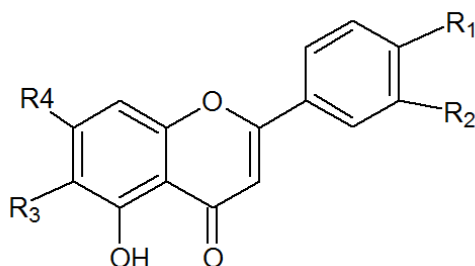
Chalkony



Obrázok 11 Chemická štruktúra chalkonov

Zdroj: vlastné spracovanie

Flavony



Obrázok 12 Základný skelet flavonov

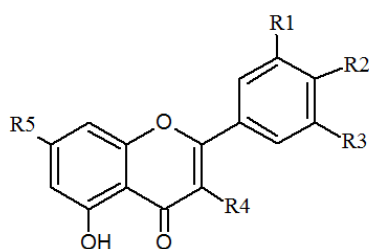
Zdroj: vlastné spracovanie

Tabuľka 5 Prehľad flavonov

Zlúčenina	R1	R2	R3	R4
Apigenin	OH	H	H	OH
Bajkalein	H	H	OH	OH
Chrysin	H	H	H	OH
Diosmin	OCH ₃	OH	H	ORut
Genkwanin	OH	H	H	OCH ₃
Isorhoifolin	OH	H	H	ORut
Luteolin	OH	OH	H	OH
Rhoifolin	OH	H	H	ONeo
Teachtchrysin	H	H	H	OCH ₃

Zdroj: vlastné spracovanie

Flavonoly



Obrázok 13 Základný skelet flavonolov

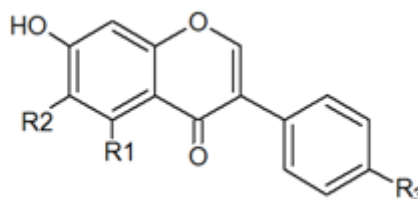
Zdroj: vlastné spracovanie

Tabuľka 6 Prehľad flavonolov

Zlúčenina	R1	R2	R3	R4	R5
Astragalin	H	OH	H	OGlc	OH
Hyperosid	OH	OH	H	OGal	OH
Isokvercitrin	OH	OH	H	OGlc	OH
Isorhamnetin	OCH ₃	OH	H	OH	OH
Kemferid	H	OCH ₃	H	OH	OH
Kemferol	H	OH	H	OH	OH
Kvercetin	OH	OH	H	OH	OH
Kvercitrin	OH	OH	H	ORha	OH
Myricentrin	OH	OH	OH	OH	OH
Rhamnetin	OH	OH	H	OH	OCH ₃
Rutin	OH	OH	H	ORut	OH

Zdroj: vlastné spracovanie

Izoflavony



Obrázok 14 Základný skelet izoflavonov

Zdroj: vlastné spracovanie

Tabuľka 7 Prehľad izoflavonov

Zlúčenina	R1	R2	R3
Biochanin A	OH	H	OCH ₃
Daidzein	H	H	OH
Formononetin	H	H	OCH ₃
Genistein	OH	H	OH
Glycitein	H	OCH ₃	OH

Zdroj: vlastné spracovanie

3 Krvné doštičky

Trombocyty sú bezjadrové, bezfarebné, okrúhle elementy krvi. Cirkulujú v neaktívnej forme a sú najmenšou časťou krvi. Dožívajú sa 9-12 dní a sú odbúrané mononukleárnym systémom ako je slezina, pečeň a kostná dreň. Membrána doštičiek je asymetrická fosfolipidová dvojvrstva. Hoci doštičky sú bezjadrové obsahujú množstvo vnútrobunkových organel. Obsahuje napríklad tubulárny systém a sekrečné orgány ako napríklad granule a lyzozómy. Tubulárny systém je odvodený od hladkého endoplazmatického retikula nájdené v rodičovskej bunke. Tubulárny systém je hlavný vápnikový orgán v krvných doštičkách a pôsobí tak, že udržiava koncentráciu voľného vápnika $[Ca^{2+}]_i$ 90 nM v cytosole. Obsahuje tiež inositoltrifosfátové receptory, ktorých agonisti aktivujú krvné doštičky tak, že dôjde k vylúčeniu Ca^{2+} z endoplazmatického retikula. Druhú významnú úlohu v tubulárnom systéme bunky je metabolizmus kyseliny arachidonovej. Kyselina arachidonová je uvoľňovaná membránou pomocou enzýmov fosfolipázou A_2 a diglyceridovou lipázou. COX a Tx syntáza sú enzýmy zapojené do postupnej premeny kyseliny archidonovej na prostaglandin H a tromboxan A_2 . Tromboxan A_2 je dôležitým mediátorom pri funkcii krvných doštičiek a naopak inhibícia tejto dráhy je primárny cieľ v protidoštičkovej terapii (McNicol a Israels, 2003).

Krvné doštičky obsahujú tri typy granúl, ktorých obsah je uvoľnený po stimulácií. α granule sú najpočetnejšou skupinou a obsahujú fibrinogén, rastové faktory a cytokíny. Doštičky obsahujú početné granule – tieto obsahujú okrem iného kalcium, serotonín, ATP. Lyzozómy obsahujú proteázy, glykozidázy, fosfatázy a aryl-sulfatázy. Krvné doštičky podliehajú rade interakciám, ktorých výsledok môže byť aktivácia (zmena tvaru, metabolizmus). Medzi extracelulárne stimuly, ktoré sú zodpovedné za funkčné zmeny doštičiek patria napríklad silný agonisti ako trombín, kolagén, prostaglandíny a Tx. ADP, vazopresín, serotonín a adrenalín zaradujeme medzi slabších agonistov.

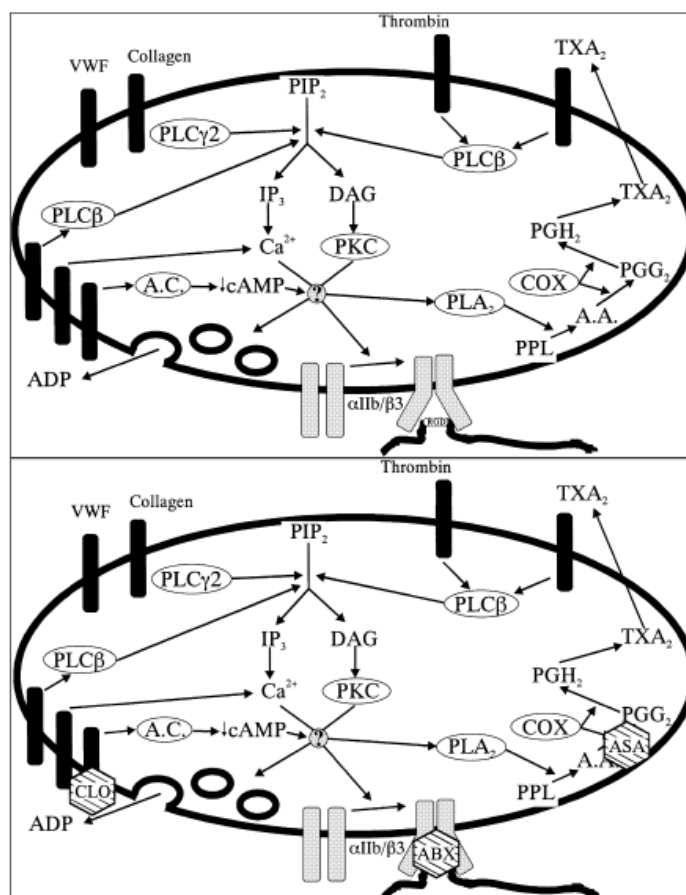
Pri aktivácií doštičiek dochádza k zvýšeniu koncentrácie voľných vápenatých iónov, k zmene membránovej štruktúry a k deformácií. Spočiatku sa trombocyty prichytia na subendoteliálny kolagén a von Willebrandov faktor v mieste poranenia a vytvoria tenkú vrstvu. Toto prichytenie je spôsobené $\alpha_2\beta_1$ integrínom, glykoproteínovým receptorom a von Willebrandovým faktorom na povrchu buniek. Krvné doštičky sú potom aktivované rôznymi látkami, ktoré pôsobia na ďalšie krvné doštičky v mieste zranenia, čo vedie k vytvoreniu hemostatickej zátky alebo agregátu.

Tento proces je aktivácie je iniciovaný špecifickými receptormi na povrchu buniek súvisiace so signálnou dráhou vo vnútri bunky. Kolagén a von Willebrandov faktor môžu byť považované ako primárni agonisti hemostázy, ADP a TXA₂ ako sekundárne, ale veľmi dôležité stimulanty. Role vazopresínu, serotonínu, IgG a epinefrinového (α_2) receptora sú kontroverzné, hoci každý môže hrať zvláštnu úlohu v špecifických hemoragických alebo trombotických stavoch (McNicol a Israels, 2003). Zhrnutie receptorov a ich agonistov je v Tab. 8. Znamé aspekty agregáčnej kaskády sú v Obr. 15.

Tabuľka 8 Receptory a agonisti krvných doštičiek

Agonista	Receptor
Von Willebrandov faktor	GPIIb α
Kolagén	$\alpha_2\beta_1$, GPVI
ADP	P2Y ₁ , P2Y ₁₂ , P2X ₁
Tromboxan A ₂	TP
Trombin	PAR ₁ , PAR ₄ , GPIIb
Faktor aktivujúci krvné doštičky	PAF receptor
Serotonín	5-HT ₂
Vazopresín	V ₁
IgG	Fc γ RIIA
Epinefrin	α_2
Fibrinogén	α IIb β_3

Zdroj: vlastné spracovanie



Obrázok 15 Mechanizmus aktivácie doštičiek a miesta pôsobenia inhibítorov

Prevzaté z McNicol a Israels, 2003

Mechanizmus agonistami indukovanú aktiváciu krvných doštičiek a miesta pôsobenia inhibítorov. Horný obrázok: aktivácia krvných doštičiek kolagénom, trombínom a ADP vrátane intracelulárnych signalizačných dráh vedúcich k produkcii TXA₂, uvoľnenie ADP z granúl a konformačné zmeny v αIIb/β₃ integrínu, ktorý umožňuje nadviazanie fibrinogénu. Spodný obrázok: Miesta pôsobenia ASA: kyseliny acetylsalicylovej, CLO: klopidogrelu, ABX: abciximabu, AA: arachidonová kyselina, PPL: fosfolipidy, A.C.: adenylátcykláza.

Antiagregačné látky

Zhlukovanie doštičiek a následná tvorba trombov prispieva k vzniku aterosklerotických plátov a môže znamenať začiatok koronárnej oklúzie a vznik infarktu myokardu. Preto látky, ktoré inhibujú agregáciu krvných doštičiek sú podávané pre špecifickú profylaxiu arteriálnej trombózy a uplatňujú sa predovšetkým v sekundárnej prevencii infarktu myokardu. Tieto látky sa obvykle podávajú súčasne s heparínom k udržadiu potrebnej perfúzie a k obmedzeniu infarktu myokardu (Lincová et al. 2007).

Kyselina acetylsalicylová

Najstaršou látkou používanou viac ako sto rokov je kyselina acetylsalicylová (ASA, aspirín). Jej mechanizmus účinku spočíva v inhibícii COX. V závislosti na dávke dochádza v krvných doštičkách, zabraňuje tvorbe agregácie pôsobiaceho TXA₂ alebo v endotelialných bunkách inhibuje syntézu antiagregačne a vazodilatačne pôsobiaceho prostacyklínu (PGI₂). Základným cieľom terapie je selektívne inhibovať syntézu doštičkového TXA₂. Zároveň neblokovať syntézu PGI₂. Práve z tohto dôvodu je účinok ASA dôležitý od množstva. Vysoké dávky kyseliny acetylsalicylovej pôsobia neselektívne a inhibujú nielen syntézu Tx ale aj PGI₂. Naopak v nízkych dávkach (100-325 mg/deň) sa ASA acetyluje a ireverzibilne inhibuje COX-1 v krvných doštičkách. Keďže krvné doštičky nie sú schopné syntetizovať cyklooxygenázu ich účinok pretrváva do doby vytvorenia nových doštičiek (cca 7 dní). Pacientom s nestabilnou anginou pectoris môže dlhodobé podávanie ASA znížiť riziko smrti až o 50% (Lincová et al. 2007).

Dipyridamol

Je koronárny vazodilatancium, ktorý neovplyvňuje agregáciu doštičiek ale znižuje adhezivitu doštičiek k poškodenému endotelu. Dipyridamol inhibuje fosfodiesterázu a zvyšuje koncentráciu cAMP v trombocytoch. Monokombinácia dipyridamolu sa neosvedčila, dobrý účinok môže byť dosiahnutý kombináciou s warfarinom alebo aspirinom (Slíva, 2010).

Antagonisti na ADP receptoroch (tiklopidín, klopidogrel, prasugrel, tikagrelor, kangrelor)

Ich mechanizmus účinku spočíva rovnako v inhibícii agregácií doštičiek, ale nemajú vplyv na metabolizmus prostaglandínov. Blokujú ADP cestu agregácie trombocytov. ADP pomocou receptorov na membránach trombocytov indukujú aktiváciu glykoproteinových buniek IIb/IIIa a tým ich schopnosť viazať fibrinogén. Používajú sa ako prevencia u pacientov s trombotickými komplikáciami, ktorí nemôžu užívať aspirín. Medzi najčastejšie nežiaduce účinky patria hemoragia, GIT problémy (Lincová et al. 2007).

Sulfinpyrazon

Patrí medzi nesteroidné antiflogistikum, kompetitívny inhibitor cyklooxygenázy (Lincová et al. 2007).

Blokátory doštičkových glykoproteinových IIb/IIIa receptorov

Tieto receptory majú komplexnú funkciu ako receptory pre fibrinogen, Von Willebrandov faktor a iné. Medzi blokátory týchto receptorov patria abciximab, tirofiban, eptifibatid. Abciximab je fragment chimerickej monoklonálnej protilátky proti IIb/IIIa receptorom. Podáva sa k ASA a heparínu. Tirofiban je nepeptidový antagonist, indikovaný pri prevencii včasného infarktu myokardu u nestabilnej angíny pectoris alebo non-Q infarktu. Bolesť hlavy, teplota, krvácanie sú najčastejšie nežiaduce účinky (Slíva, 2010).

Hemokoagulácia a liečivá, ktoré na ňu pôsobia

Zrážanie krvi alebo hemokoagulácia je súbor enzymatických reakcií, ktorých výsledkom je tvorba nerozpustnej siete tvorenej fibrínom v ktorej sa zachytia erytrocyty a trombocyty. Pri nedostatku koagulačných faktorov, ktorý väčšinou vzniká na genetickom podklade, alebo pri závažných systémových ochoreniach sa podávajú koagulačné faktory. Nedostatok fibrinogénu môže byť buď vrodený, pri poškodení pečene alebo v dôsledku jeho zvýšenej spotreby. Okrem fibrinogénu sa najčastejšie podávajú koagulačné faktory VII u hemofilie typu A, faktor VIII s von Willebrandovým faktorom u von Willebrandovej choroby, koagulačný faktor IX u hemofilie typu B, koagulačný faktor VII pri jeho nedostatku, a ich kombinácie.

Heparín

Heparín je jeden z najstarších antikoagulantov. Označuje sa aj ako nefrakciovaný heparín hlavne pre odlišenie od dnes používaných nízkomolekulárnych heparínov. Heparín je fyziologický produkovaný žírnymi bunkami v tkanivách cicavcov a skladá sa zo smesi sulfonovaných mukopolysacharidov. Pôsobením heparínu dochádza k blokáde stupňov koagulačného procesu a zabráneniu premeny fibrinogenu na fibrín. Ovplyvňuje tiež funkciu krvných doštičiek (Lincová et al. 2007).

Nízkomolekulárne heparíny

Patria medzi ne dalteparín, enoxaparín, nadroparín, parnaparín, reviparín a bemiparín vyznačujú sa molekulovou hmotnosťou okolo 2000-9000 daltónov, lepšou antikoagulačnou schopnosťou, majú lepšie farmakokinetické vlastnosti a menej nežiaducich účinkov. Líšia sa spôsobom výroby, dĺžkou reťazca a tým sú spôsobené aj rozdiely v účinnosti a predovšetkým v pomere ich inhibičného účinku proti faktorom Xa a proti faktoru II. Vďaka tomu, že majú dlhší účinok ich možno podávať 1 krát denne a nespôsobujú trombocytopeniu (Lincová et al. 2007).

Priame inhibitory faktoru Xa

Fondaparinux a rivaroxaban sú selektívne inhibitory aktivovaného faktoru X (Xa). Fondaparinux selektívnou väzbou na antitrombin zosilňuje prirodzenú neutralizáciu faktoru Xa antitrombinom. Neutralizáciu faktoru Xa sa prerušuje kaskáda zrážania krvi a inhibuje sa vznik trombu aj tvorba trombinu (Lincová et al. 2007).

Priame inhibitory trombínu

Desirudin, lepirudin, bivalirudin a dagibatran selektívne inhibujú cirkulujúci aj voľný aj v krvnej zrazenine viazaný trombín. Trombín slúži k rozloženiu fibrinogénu na monoméry a k aktivácii faktoru XIII na XIIIa a hraje hlavnú rolu v trombotickom procese. Trombin aktivuje krvné doštičky tak, že stimuluje ich agregáciu a uvoľňuje ich súčasti a taktiež aktivuje faktory V a VIII (Lincová et al. 2007).

Nepriame antikoagulancia

Warfarín patrí medzi nepriame antikoagulancia. Pôsobí na tvorbu niekoľko koagulačných faktorov v pečeni, ktorých tvorba je závislá od vitamínu K. Je kompetitívny antagonist vitamínu K. Tvorba warfarinu v pečeni trvá 3 dni, preto sa jeho plný účinok dostaví až po 3 dňoch podávania. Warfarín sa podáva dlhodobo pacientom a spravidla sa podáva po liečbe heparínom, či nízkomolekulárnymi heparinami. Keďže warfarín má nízky terapeutický profil jeho účinnosť sa sleduje protrombínovým časom (INR – meria sa čas do vzniku prvého fibrinového vlákna, ktorý musí byť v rozmedzí 2-4,5 podľa indikácie). Metabolizmus warfarinu môže byť ovplyvnená mnohými liečivami, ktoré ovplyvňujú cytochróm P450. Vďaka možnosti perorálneho podávania je zatiaľ najrozšírenejší antikoagulačný prípravok (Lincová et al. 2007). Možné interakcie sú uvedené v Tab. 9.

Tabuľka 9 Prehľad vybraných látok na účinok perorálnych antikoagulancií

Zvyšujú	Znižujú
Alkohol (akútne), alopurinol, ASA, kortikoidy,	Alkohol (chronicky), antacida, barbituráty, carbamazepin,
niektoré antibiotika, cimetidin, clofibrát,	cholestyramin, diuretika,
niektoré nesteroidné antiflogistika	meprobamát, perorálne kontraceptíva,
metronidazol, perorálne hypoglykemika,	penicilín (veľké dávky)
fenylbutazon, chinidín, chinin, vitamín E,	primidon
tricyklické antidepresíva, isoniazid	vitamín K (veľké dávky)

Zdroj: vlastné spracovanie

Fibrinolytika

Fibrinolytika sú liečivá, ktoré sú schopné zmenšiť a ovplyvniť trombus. Viazu sa na plazminogén prítomný v krvnej zrazenine, na plazmín čo spôsobí rozpustenie zrazeniny. Medzi nešpecifické fibrinolytika patria urokináza a streptokináza. Anistrepláza je derivátom streptokinázy, proenzým, ktorý má funkciu proliečiva, z ktorého sa deacyláci uvoľňuje streptokináza. Ide o komplex streptokinázy a plazminogénu. Urokináza je proteínový enzým produkovaný obličkami a vylučovaný močom. Preto sa niekedy označuje ako uPA (urinárny typ aktivátora plazminogénu). Od urokinázy boli novšie biotechnologicky pripravené účinné deriváty, nasarupláza a neskôr sarupláza.

Špecifické aktivátory plazminogénu, altepláza, retepláza, tenektpláza, k svojej aktivácii potrebujú fibrín sa označujú ako tPA (tkaninový aktivátor plazminogénu). Od prirodzeného tkanivového aktivátora sa líši štruktúrou či výmenou aminokyseliny. Endogénny tPA je polypeptid obsahujúci 527 aminokyselín. Tento enzým je pre krátky polčas pre použitie nevhodný. Stal sa však predlohou, od ktorej boli rekombinantnou technológiou pripravené trombolyticky účinné deriváty, pre ktoré je charakteristická koncovka "tepláza. Altepláza (rtPA) je rekombinantnou formou ľudského tkanivového aktivátora plazminogénu. Jedná sa o biotechnologicky pripravený glykoproteín. Do tejto skupiny patria tiež tenektepláza (TNKtPA). To je upravená molekula ľudského tkanivového aktivátora plazminogénu, ktorá je produkovaná technológiou rekombinantnej DNA (Kolář, 2008).

Väzbou na fibrinovú zložku menia v trombe viazaný plazminogén na plazmín, ktorý odbúra fibrínový základ trombu bez systémovej aktivácie plazminu (Slíva, 2010).

Antifibrinolytika

Ich mechanizmus účinku je inhibovať účinok proteolytických enzýmov, ktoré môžu aktivovať fibrinolytický proces. Väčšinou zabraňujú väzbe plazmínu na fibrín. Patria medzi ne kyselina ϵ -aminokapronová (EACA), kyselina tranexamová, kyselina p-aminomethylbenzoová (PAMBA) a aprotinin (Lincová et al. 2007).

4 Antiagregačné účinky flavonoidov

Agregácia krvných doštičiek je základným predpokladom pre širokú škálu patofyziologických procesov, v udalostiach v rozmedzí od normálnej koagulácie krvi až do extrémov aterosklerózy (Kelly et al. 1996).

4.1 Agregácia navodená kolagénom

Na agregáciu krvných doštičiek indukovanú kolagénom bolo vykonaných 9 štúdií, kde boli testované rôzne flavonoidy.

V prvej práci bol analyzovaný extrakt z *Sophora japonica*. Tiež boli izolované 4 flavonoidy a 6 flavonoidných glykozidov z listov a stonky *Sophora japonica* na potkanie krvné doštičky. Bola použitá krv bohatá na krvné doštičky. K porovnaniam bol použitý ASA. Biochanin (č. 1 v Tab. 10) ukázal väčší efekt na kolagén ako ASA. Genistein (č. 3 v Tab. 10) bol asi desaťkrát väčší inhibítor kolagénu ako biochanin. Rutín (č. 10 v Tab. 10) bol veľmi miernym inhibítorom (Kim et al. 2008).

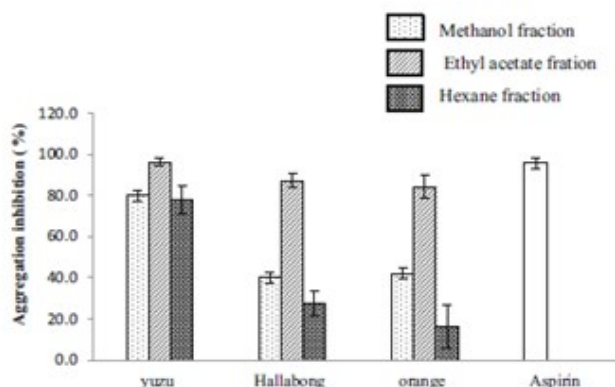
Tabuľka 10 Protidoštičkový efekt flavonoidov izolovaných s. japonica

Compound	IC ₅₀ (μM)		
	AA ^{a,b}	Collagen ^b	U46619 ^{c,d}
ASA ^a	63.0	460.0	350.0
1	19.9	147.0	99.8
2	1.6	>300.0	15.6
3	20.3	14.8	53.8
4	>300.0	>300.0	>300.0
5	>300.0	>300.0	>300.0
6	>300.0	>300.0	>300.0
7	25.9	>300.0	123.4
8	67.3	72.3	61.0
9	38.0	>300.0	>300.0
10	>300.0	>300.0	>300.0

Tri zlúčeniny boli identifikované ako izoflavóny: biochanín A č. 1, irizolidón č. 2 a genisteín č. 3; štyri boli identifikované ako izoflavónové glykozidy: Sisotrín č. 4, soforabiozid č. 5, genistin č. 6 a tektoridín č. 7 a flavonoidy apigenin č. 8, kvercitrin č. 9 a rutin č. 10. Zdroj: Kim et al. 2008

V podobnej štúdií boli tri rôzne extrakty (metanol, etylacetát, hexán) z yuzu hodnotené na ich antioxidačnú aktivitu a protidoštičkové účinky. Inhibícia potkaních krvných doštičiek (PRP) bola indukovaná kolagénom a k porovnaniu boli testované tiež výťažky z citrusových plodov a ASA. Všetky frakcie inhibovali agregáciu doštičiek v rôznej miere.

Extrakt Yuzu, ktorý obsahuje flavonoidy hesperidin, naringin a fioletin, v koncentrácií 1 mg / ml zablokoval funkciu doštičiek $96,1 \pm 1,8$ (etylacetátový extrakt), $79,9 \pm 2,1$ (metanol) a $77 \pm 6,7\%$ (hexán, Obr. 16). 0,3 mg / ml aspirínu inhiboval agregáciu krvných doštičiek vyvolanú kolagénom o 95,7%, čo je takmer rovnaká ako 1 mg / ml etylacetátu extraktu yuzu (Assefa et al. 2016).



Obrázok 16 Inhibičný efekt Yuzu na krvné doštičky indukovanú kolagénom

Zdroj: Assefa et al. 2016

V ďalšej štúdií bol účinok katechínu a kvercetínu na agregáciu ľudských krvných doštičiek meraný za použitia dvoch rôznych koncentrácií kolagénu. Obaja katechín a kvercetin inhibovali kolagénom indukovanú agregáciu premytých krvných doštičiek (Tab. 11). Stupeň inhibície bol závislý od koncentrácie použitého kolagénu (Pignatelli et al. 2000). Katechín a kvercetin samostatne (v koncentráciách katechín 25 $\mu\text{mol/l}$, kvercetin 5 $\mu\text{mol/l}$) nemali žiadnen účinok, ale dokopy mali účinok až 55%.

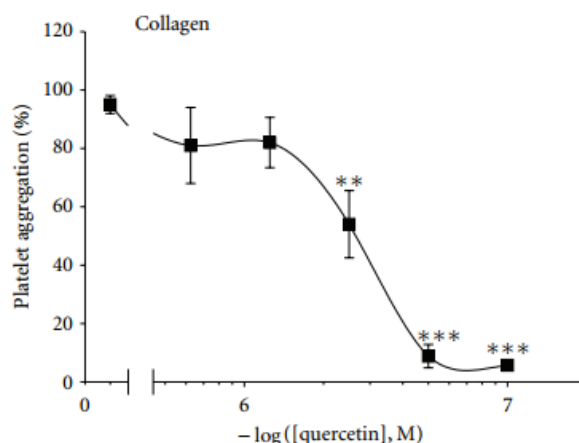
Tabuľka 11 Porovnanie inhibície agregácie krvných doštičiek indukovanú kolagénom u katechínu a kvercetínu

Zlúčenina ; c= $\mu\text{mol/l}$	Kolagén 2mg/l	Kolagén 4mg/l
Katechín; 100	75%	39%
Kvercetin; 20	50%	43%
Katechín 25 a kvercetin 5	55%	55%

Zdroj: vlastné spracovanie podľa výsledkov Pignatelli et al. 2000

Podobné výsledky inej skupiny ukázali, že kvercetin v koncentrácií 100 μM inhiboval kolagénom indukovanú agregáciu ľudských krvných doštičiek (PRP) >90% a v koncentrácií 200 μM došlo dokonca ku kompletnej inhibícii (Mosawy, et al. 2013).

Kvercetin inhiboval agregáciu potkaních krvných doštičiek indukovanej kolagénom (2,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Päťdesiat percent inhibičnej koncentrácie kvercetínu na PRP uvedenom agoniste bola odhadnutá na 25,0 \pm 4,4 μM – Obr. 17 (Oh et al. 2012).



Obrázok 17 Inhibičná aktivita kvercetinu na kolagén

Zdroj: Oh et al. 2012

Vo výskume Hubbard et al. (2003) bola študovaná inhibícia ľudských krvných doštičiek kvercetinom. Výsledky sú odvodené z troch samostatných experimentov. Ako rozpúšťadlo bolo použité DMSO, ktoré nemalo žiaden vplyv na agregáciu premytých doštičiek. Kvercetin tiež inhiboval agregáciu doštičiek v závislosti na iných agonistov.

Avšak, tento účinok bol menej účinný v porovnaní s inhibičným účinkom kvercetinu na kolagénom stimulovanú agregáciu krvných doštičiek. Tabuľka 12 zobrazuje hodnoty IC_{50} na inhibíciu agregáciu krvných doštičiek.

Tabuľka 12 Inhibícia krvných doštičiek kvercetinom

Collagen $\mu\text{g mL}^{-1}$	IC_{50} (quercetin) μM ($n = 3$) \pm SEM
5	8.69 ± 1.05
4	6.47 ± 1.09
3	4.93 ± 1.12
2	4.87 ± 1.11
1	3.02 ± 1.05
0.5	2.37 ± 1.03

Zdroj: Hubbart et al. 2003

Nedostatočné chápanie vzťahu medzi štruktúrou flavonoidov a ich inhibičnou aktivitou na funkciu ľudských krvných doštičiek bolo predmetom štúdie Wright et al. (2010). Napriek podobným účinkom, pri koncentrácii $10 \mu\text{M}$ apigenin spôsobil väčšiu úroveň inhibície, než kvercetin. Inhibícia agregácie premytých doštičiek spôsobená $10 \mu\text{M}$ a $40 \mu\text{M}$ apigeninom boli identické, zatiaľ čo $40 \mu\text{M}$ kvercetin úplne inhiboval agregáciu. Pri rovnakej koncentrácii ($40 \mu\text{M}$), tamarixetin, kvercetin-3'-sulfát tiež úplne inhibovali agregáciu. Apigenin a kvercetin boli najúčinnnejšie testované flavonoidy.

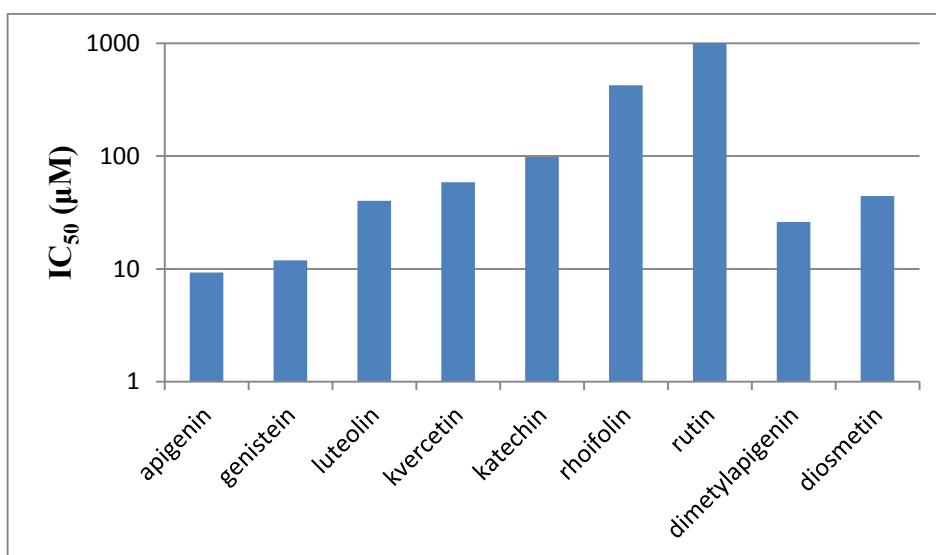
Oproti tomu, katechín bol najmenej účinný flavonoid s inhibičnou účinnosťou o dva rády nižšou než kvercetin. Metabolity kvercetin a apigenin môžu byť účinnými inhibítormi krvných doštičiek. Na základe výsledkov (Tab. 13) bolo vytvorené poradie účinnosti flavonoidov kvercetin = apigenin > tamarixetin = kvercetin-3'-sulfát > kvercetin-3-glukuronid > katechín (Wright et al. 2010).

Tabuľka 13 Inhibícia agregácie flavonoidmi

Flavonoid/metabolite	logIC ₅₀ ± SEM (M)		Rmax ± SEM (aggregation-% of control)		Hill slope ± SEM	
	Aggregation	5-HT secretion	Aggregation	5-HT secretion	Aggregation	5-HT secretion
Quercetin	-5.17 ± 0.04	-5.11 ± 0.02	100 ± 0	96 ± 0	-2.79 ± 0.69	-2.04 ± 0.27
Tamarixetin	-4.75 ± 0.05	-4.66 ± 0.18	96 ± 4	83 ± 3	-2.99 ± 0.80	-1.69 ± 0.60
Quercetin-3'-sulphate	-4.72 ± 0.01	-4.73 ± 0.03	100 ± 0	100 ± 0	-10.71 ± 2.49	-2.48 ± 0.41
Apigenin	-5.31 ± 0.04	-5.36 ± 0.04	100 ± 0	87 ± 2	-2.23 ± 0.43	-2.19 ± 0.32
Catechin	-3.44 ± 0.05	-3.45 ± 0.04	100 ± 0	100 ± 0	-2.91 ± 0.82	-1.51 ± 0.19

Sily boli vypočítané ako koncentrácia flavonoidov (kvercetin, apigenín a katechín) alebo metabolitov (tamarixetin a kvercetin-3'-sulfát), ktoré inhibovali agregáciu alebo sekréciu 5-HT o 50% (IC₅₀). Hodnoty LogIC₅₀ sa vypočítali pomocou nelineárnej regresie a premennej sklonu krivky (Hill slope) s inhibičnými konštantami (maximálna a minimálna % agregácia) individuálne stanovená pre každú zlúčeninu. SEM bola odvodená z logIC₅₀ troch individuálnych výsledkov meraní. Zdroj: Wright et al. 2010

V štúdií Guerrero et al. (2004), bolo pozorované, že krátka inkubácia doštičiek s niektorými flavonoidmi spôsobila inhibíciu agregácie závislú na koncentrácii. Výsledky sú zhrnuté v Obr. 18.



Obrázok 18 Porovnanie IC₅₀ rôznych flavonoidov na agregáciu krvných doštičiek navodením kolagénom v koncentrácii

Na testovanie bola použitá ľudská krv od dobrovoľníkov atestované prebiehalo na premytých krvných doštičkách. Zdroj: vlastné spracovanie podľa Guerrero et al. 2004

V ďalšej štúdií boli skúmané účinky na agregáciu doštičiek 6 koncentrácií čistého kvercetin-3- glukozidu, aglykónu kvercetinu, aglykónu apigeninu a katechínu. Účinky neboli skúmané v celej krvi, pretože v celej krvi je indometacín stabilný iba < 30 min. Indometacín, špecifický inhibítor enzýmu cyklooxygenázy, bol použitý ako pozitívna kontrola. Agregácia v plazme bola stimulovaná do konečnej koncentrácie 2 mg kolagén. Agregácia v premytých krvných doštičkách bola indukovaná 2,5 mg kolagénu. Indometacín v koncentrácii 1 μ M zablokoval kolagénom indukovanú agregáciu v plazme bohatej na ľudské krvné doštičky o 67 % a v premytých doštičkách o 74 %. Katechín inhiboval kolagénom indukovanú agregáciu v plazme bohatej na doštičky podstatne iba pri koncentrácii 2500 μ M. Apigenin v koncentrácii 2,5 μ M inhiboval kolagénom indukovanú agregáciu v plazme bohatej na doštičky o 24 \pm 34 %. Koncentrácia 2500 μ M významne inhibovala vyvolanej kolagénom agregácie o 91 \pm 4 %. V plazme bohatej na krvné doštičky, flavonol kvercetin významne inhibovali kolagénom indukovanú agregáciu o 95 \pm 4 %. Nižšie koncentrácie kvercetinu boli neúčinné. Koncentrácie 0,25 až 2500 μ M flavonolu kvercetin-3-glukozid významne neovplyvnila agregáciu doštičiek. Výsledky sú v Tab. 14 (Janssen et al. 2013).

Tabuľka 14 Účinok flavonoidov na inhibíciu agregácie indukovanú kolagénom

Flavonoid; koncentrácia (μ mol/l)	Inhibícia agregácie iniciovaná kolagénom(%)
Katechín; 2500	59 \pm 25
Apigenin; 2,5	24 \pm 34
Apigenin; 2500	91 \pm 4
Kvercetin; 2500	95 \pm 4
Kvercetin, nižšia koncentrácia	0
Kvercetin 3- glukozid; 0,25-2500	0

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa výsledkov Janssen et al. 2013

Z publikovaných výsledkov je obtiažne vyvodit' nejaký jednoznačný záver. Určitý obrázok si je možné urobiť z tabuľky 15, ktorá sumarizuje výsledky s kvercetinom. Je z nej dobré vidieť výrazné rozdiely medzi jednotlivými štúdiami, ktoré použili podobnú alebo rovnakú dávku induktorov, ale dosiahli výrazne odlišných výsledkov. Krvné doštičky sú citlivé na osobitné zaobchádzanie a v dôsledku toho sa môžu aktivovať predčasne, a to by mohlo mať vplyv na výsledky (Mosawy, 2015).

Tabuľka 15 Pôsobenie kvercetinu na kolagénom navodenú agregáciu podľa štúdií

Koncentrácia kolagénov	Kvercetin (μM)	Použité krvné doštičky (premyté/PRP)	Inhibícia (%)	Autor
2.5mg/L	2500	PRP; ľudské	95 \pm 5	<i>Janssen et al. 2013</i>
2.5mg/L	0,25; 2,5; 25; 250	PRP; ľudské	Neaktívne	<i>Janssen et al. 2013</i>
2mg/L	20	Premyté; ľudské	50	<i>Pignatelli et al. 2014</i>
4mg/L		Premyté; ľudské	43	
2,5 $\mu\text{g/ml}$	100	Premyté; potkania	25,0 \pm 4,4	<i>Oh et al. 2012</i>
5 $\mu\text{g/ml}$	8,69 \pm 1,05	Premyté; ľudské	50	<i>Hubbard et al. 2003</i>
4 $\mu\text{g/ml}$	6,47 \pm 1,09	Premyté; ľudské	50	
3 $\mu\text{g/ml}$	4,93 \pm 1,12	Premyté; ľudské	50	
2 $\mu\text{g/ml}$	4,87 \pm 1,11	Premyté; ľudské	50	
1 $\mu\text{g/ml}$	3,02 \pm 1,05	Premyté; ľudské	50	
0,5 $\mu\text{g/ml}$	2,37 \pm 1,03	Premyté; ľudské	50	
5 $\mu\text{g/ml}$	40	Premyté; ľudské	100	<i>Wright et al. 2010</i>
5 $\mu\text{g/ml}$	100	PRP; ľudské	>90	<i>Mosawy et al. 2013</i>

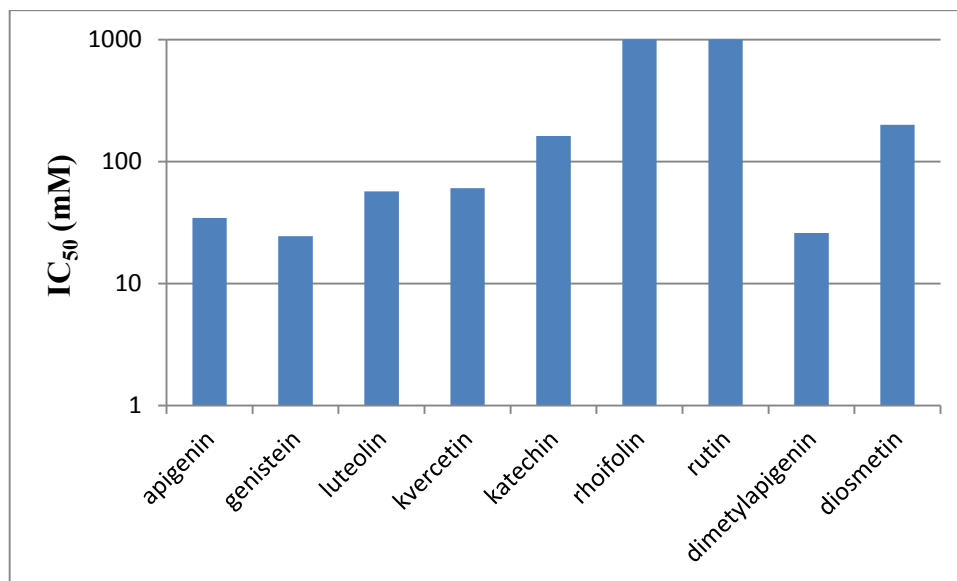
Zdroj: vlastné spracovanie podľa výsledkov štúdií

4.2 Agregácia navodená kyselinou arachidonovou

Dostupné štúdie ukazujú, že flavonoidy sú schopné inhibovať agregáciu krvných doštičiek vyvolanou podaním AA.

V štúdií Guerrero et al. (2004), bolo pozorované, že krátka inkubácia ľudských doštičiek (PRP) niektorými flavonoidmi spôsobila inhibíciu agregácie závislú na koncentrácii (Obr. 19). Najúčinnějšími látkami boli rhoifolin a rutin, ktoré dosiahli IC₅₀ v koncentraciách 50 μM .

Na druhej strane v inej štúdií na PRP od zdravých dobrovoľníkov, apigenin, kvercetin ani morin neinhibovali agregáciu doštičiek indukovanú AA (10 μM) v koncentraciách 40 μM kvercetin, 420 μM morin a koncentrácia apigeninu nebola uvedená. Prekvapivo myricetin inhiboval AA- indukovanú agregáciu o 75% v koncentracii 100 μM . Výsledky s premytými doštičkami boli rozdielne, flavonoidy okrem apigeninu boli účinné v koncentraciách 420, 100 a 40 μM (Kelly et al. 1996).



Obrázok 19 Porovnanie IC₅₀ na inhibíciu agregácie krvných doštičiek vyvolanou 10 μM AA

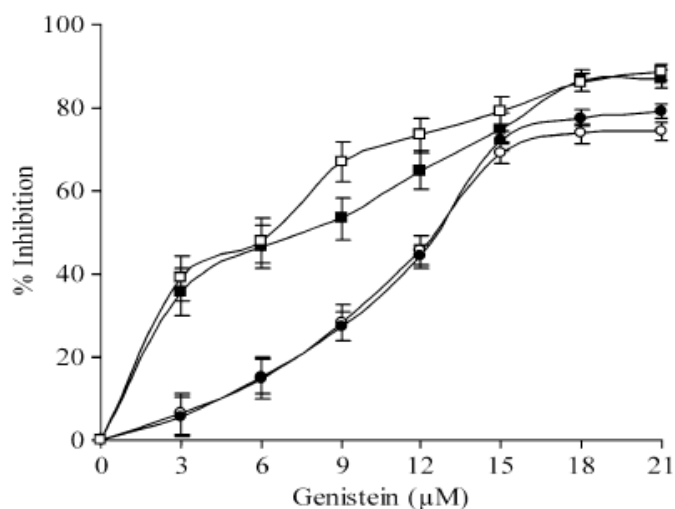
Zdroj: vlastné spracovanie podľa výsledkov Guerrero et al. 2004

Vo vyššie spomínanej štúdií extrakty zo *Sophora japonica* boli tiež skúšané na agregáciu indukovanú AA (20 - 40 μM). Biochanin (IC₅₀ 19,9 μM) ukázal väčší efekt ako ASA. Irisolidone (IC₅₀ 1,6 μM) bol dokonca 6-12 násobne silnejší inhibítor než biochanin. Genistein (IC₅₀ > 300 μM) bol rovnako aktívny ako biochanin indukovanej agregácie. Kvercitrin (IC₅₀ 38 μM) tiež ukázal inhibičný vplyv na túto agregáciu indukovanú AA. Rutín (IC₅₀ > 300 μM) bol veľmi miernym inhibítorom (Kim et al. 2008).

4.3 Vplyv na fosfolipázu A₂

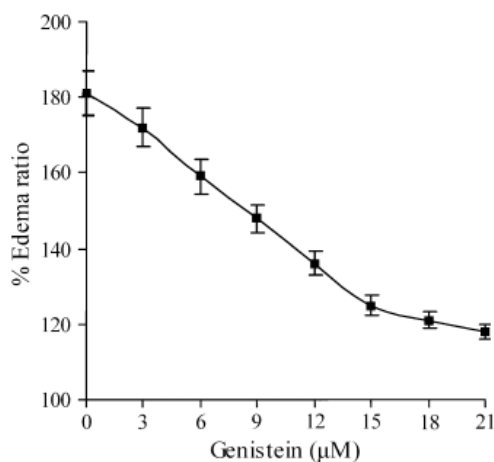
Fosfolipáza A₂ (PLA₂) hrá kľúčovú úlohu v tvorbe zápalových mediátorov ako sú prostaglandíny, leukotriény, aktivovaný doštičkový faktor, lysofosfolipidy a PLA₂ sa preto považuje za rozhodujúci enzým zápalu. V posledných rokoch bol identifikovaný celý rad rôznych typov PLA₂. Napríklad, skupina I (PLA₂-I) a skupina II (PLA_i-II) sú obe sekrečné (Ca²⁺ dependentné) sPLA₂, ale s rozdielmi v aminokyselinovej sekvencii. PLA₂-E je prítomný v pankreatickej šťave (Lindahl a Tagesson 1997). Inhibícia PLA₂ je dôležitá v neutralizácii zápalu a zabráňuje aktivácií kaskády kyseliny arachidonovej. PLA₂ sprostredkuje tiež prvý krok v AA-ceste agregácie krevných doštičiek, pretože uvoľňuje AA z cytoplasmatickej membrány (Dharmappa et al. 2009).

V štúdií Dharmappa et al. (2009) genistein inhiboval všetky sPLA₂ enzýmy. Mnoho inhibítorov inhibuje sPLA₂ aktivitu buď väzbou na substrát alebo chelataciou vápnika. Inhibícia genisteínom je nezávislá na substráte a koncentrácií vápnika a výsledky ukazujú, že genistein sa viaže priamo na sPLA₂ a ireverzibilne ju inhibuje. Vzhľadom k tomu, že genistein účinne inhiboval *in vitro* a *in situ* sPLA₂ aktivitu (Obr. 20), bol skúmaný jeho *in vivo* účinok na edém. Genistein inhiboval edém v závislosti na dávke a pri koncentrácii 18 μM bol edém výrazne znížený (Obr. 21).



Obrázok 20 Percentuálna inhibícia sPLA₂ genisteínom

Reakčná zmes obsahovala sPLA₂ z: VRV-PL-V- jed z *Vipera russelli* (Vyplnený kruh), HSF-PLA₂- ľudská synoviálna tekutina (prázdny štvorec), HPF-PLA₂ - ľudská pleurálna tekutina (plný štvorec) a NN-PL-I - fosfolipáza-I z *Naja naja* (otvorený kruh)
Zdroj: Dharmappa et al. 2009

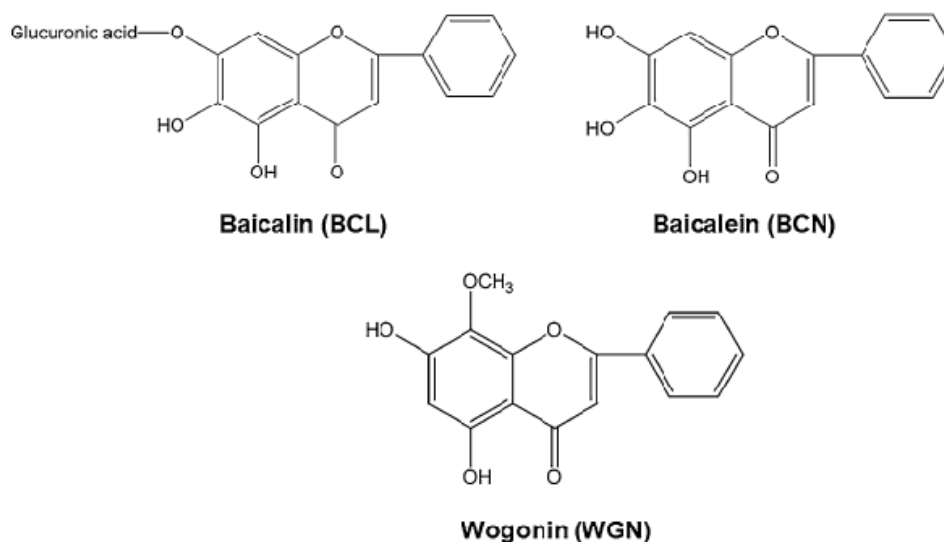


Obrázok 21 Inhibícia edému genisteínom

Edema ratio - pomer edématoznej končatin k normálnej hmotnosti končatiny

Zdroj: Dharmappa et al. 2009

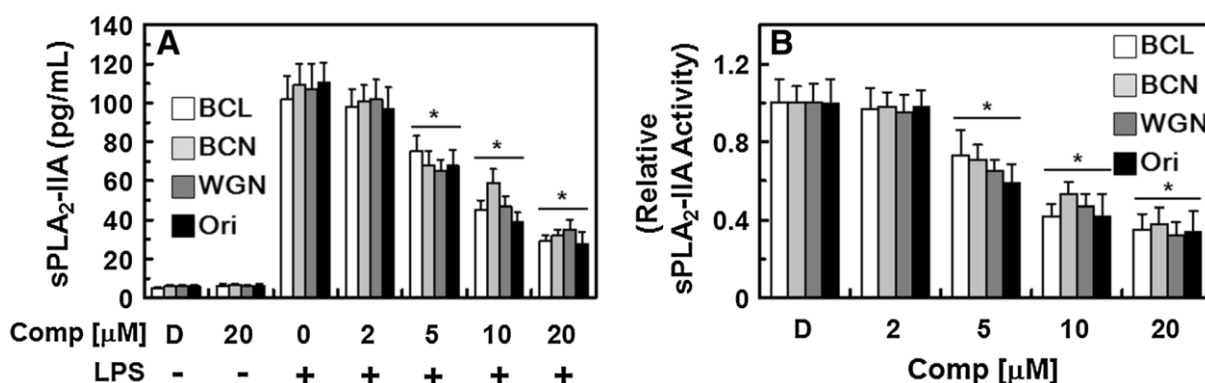
V inej štúdií, tri štrukturálne podobné flavonoidy, ktoré sú aktívne zlúčeniny nachádzajúce sa v čínskej droge nazývanej Huang qui (*Radix Scutellariae, baicalensis, šišák bajkalský*) a to baicalin, baicalein a wogonin (Obr. 22), boli skúmané na ich účinky na expresiu a aktivitu sPLA₂-IIA *in vitro* a *in vivo*.



Obrázok 22 Chemická štruktúra flavonoidov z koreňa šišáku bajkalského

Zdroj: Ku et al. 2015

Tieto flavonoidy v koncentráciách 5 - 20 μM inhibovali expresiu cystolickej fosfolipázy (sPLA₂-IIA) v lipopolysacharide (LPS) stimulovanými ľudskými endoteliálnymi bunkami pupočnej žily (HUVEC) (Obr. 23 A). Orientin (8-C glukozid luteolínu) bol použitý ako pozitívna kontrola pretože sa v predchádzajúcom testovaní Lee et al. (2014) ukázal ako vhodné terapeutické činidlo proti zápalu. Okrem toho, tieto flavonoidy inhibovali v závislosti na dávke sPLA₂-IIa Obr. 23 B (Ku et al. 2015).

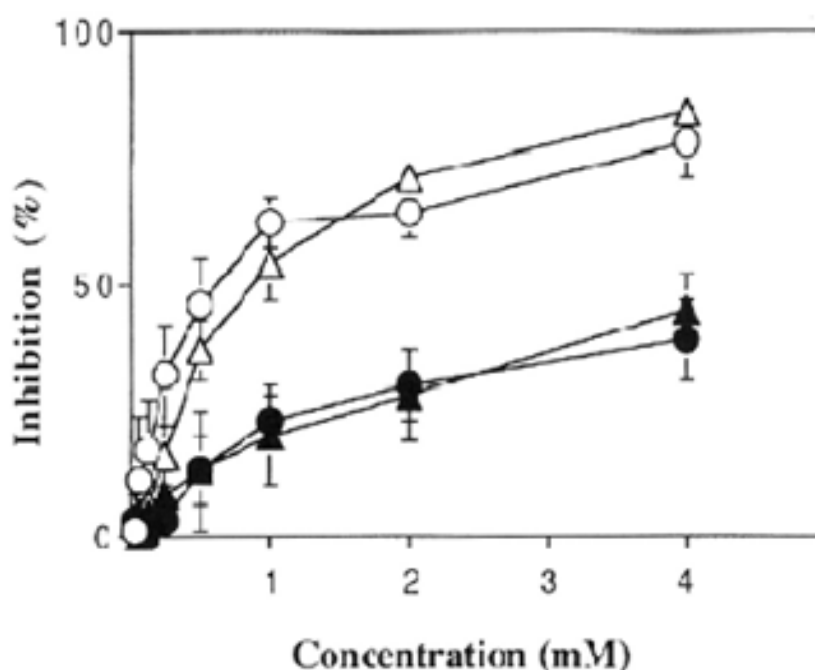


Obrázok 23 Efekt flavonoidov na expresiu a aktivitu cystolickej fosfolipázy A₂
A: Vplyv na expresiu sPLA₂ a B: vplyv na aktivitu

Zdroj: Ku et al. 2015

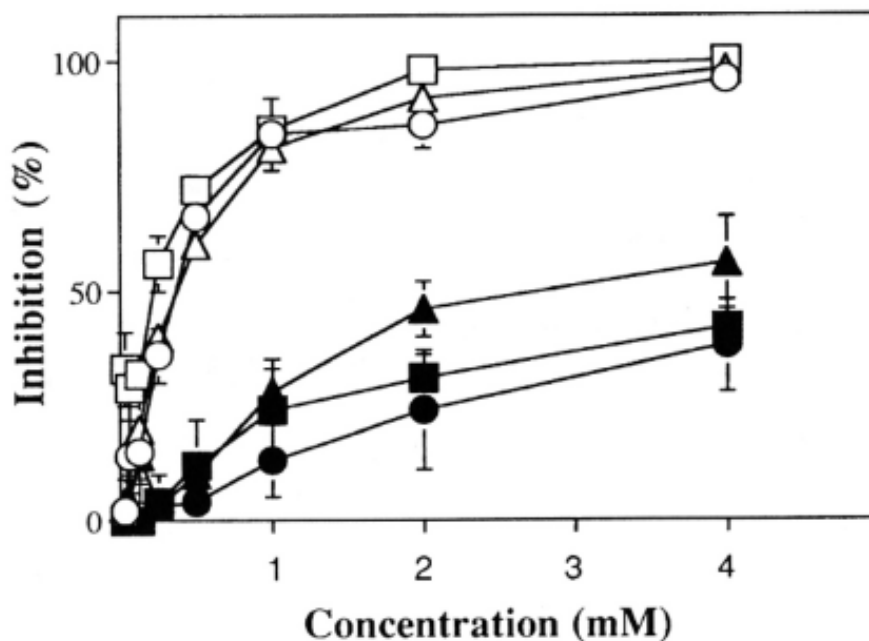
V ďalšej štúdií bol sledovaný účinok rutínu na skupiny fosfolipázy A₂ I a II (obr. 24 a 25). Rutín účinne inhiboval PLA₂-II spôsobom závislým od dávky. Oproti tomu, rutín bol len veľmi slabý inhibítor PLA₂-I v prasacom pankrease. Účinok rutínu na ľudské skupiny I a II fosfolipázy A₂ z pankreatickej šťavy a synoviálnej tekutiny, bol, že efektívne inhiboval všetky PLA₂ frakcie zo synoviálnej tekutiny.

Na druhú stranu žiadne PLA₂ frakcie z pankreatickej šťavy neboli inhibované o viac ako 40% (Lindahl a Tagesson, 1997). Je nutné však kriticky dodať, že koncentrácie použité v tejto štúdií boli viac ako teoretické, pretože sa pohybovali v jednotkách mM a teda v klinicky nedosiahnuteľných koncentráciách.



Obrázok 24 Inhibícia PLA₂ I a II rutínom z prasacieho pankreasu

PLA₂-I z prasacieho pankreasu v koncentrácií 0 (●-●), z *Naja naja* (▲-▲), PLA₂-II z *Crotalus atrox* (○-○), a z *Vipera russelli* (△-△) Zdroj: Lindahl a Tagesson, 1997

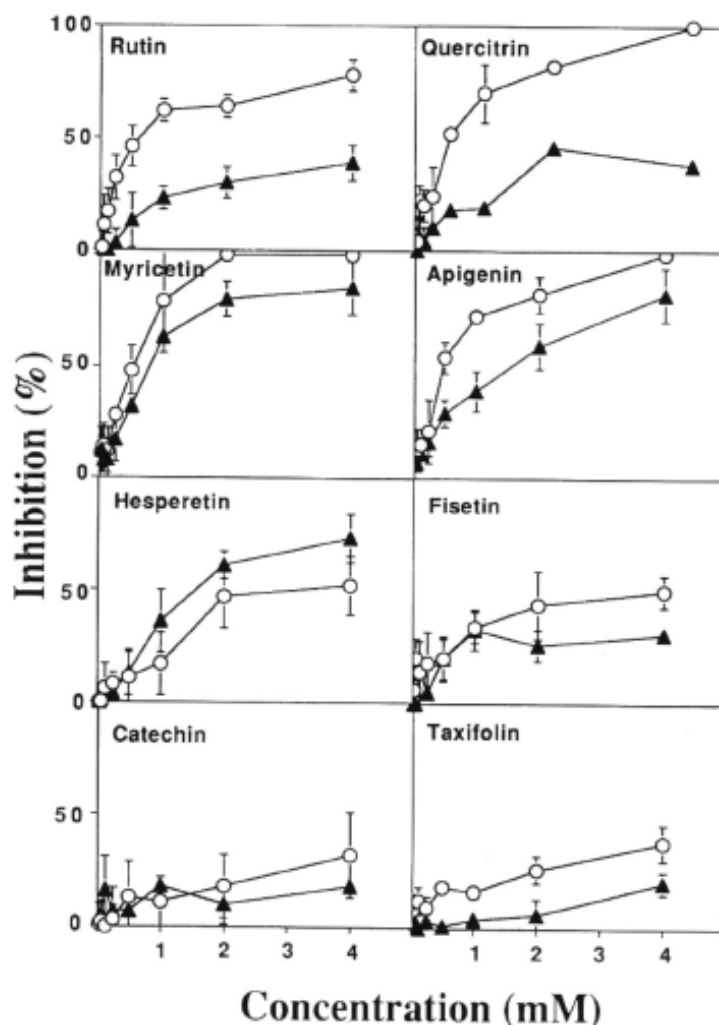


Obrázok 25 Inhibícia ľudského PLA₂ I a II rutínom

(●-●) PLA₂-I z pankreatickej šťavy v koncentrácii 0M; (▲-▲) PLA₂-I z pankreatickej šťavy v koncentrácii 0,1 M; (■-■) PLA₂-I z pankreatickej šťavy v koncentrácii 0,7 M; (O-O) PLA₂-II zo synoviálnej tekutiny v koncentrácii 0,3 M; (Δ-Δ) PLA₂-II zo synoviálnej tekutiny v koncentrácii 0,4 M; (□-□) PLA₂-II zo synoviálnej tekutiny v koncentrácii 0,7 M
Zdroj: Lindahl a Tagesson, 1997

V ďalšej časti tejto štúdie bol porovnávaný rutin a sedem ďalších štruktúrne blízkych flavonoidov na ich schopnosť inhibovať PLA₂-I a PLA₂-II (Obr. 26). Opäť išlo o milimolárnu koncentráciu. 3-hydroxylová skupina nemala veľký vplyv na účinok, pretože pri porovnávaní rutínu (má rhamnosyl naviazaný na polohe 3) s jeho aglykonom kvercetinom boli diasiahnuté podobné inhibície.

Tri hydroxylové skupiny na kruhu B sa javia ako výhodné, pretože myricetin bol účinnější než kvercetin, ktorý sa od nej líši iba absenciou jednej hydroxyskupiny na zmiernenom kruhu. Účinný bol tiež flavon apigenin, ktorý nemá 3-hydroxyskupinu a má jednu hydroxyskupinu na kruhu B. Zaujímavé je, že taxifolin, ktorý sa líši od kvercetinu iba absenciou dvojitej väzby, bol prakticky bez účinku. Planárna konformácia bude teda dôležitá. Katechin, lišiaci sa od taxifolinu absenciou 3-hydroxyskupiny bol tiež neúčinný. 5-hydroxyskupina bude asi mať tiež význam, pretože fisetin, ktorý sa líši iba jej absenciou oproti kvercetin, mal nižší účinok.

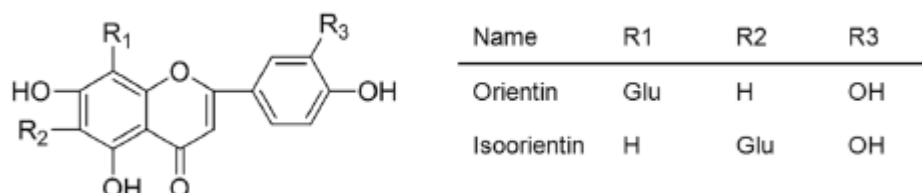


Obrázok 26 Inhibícia PLA₂-I a PLA₂-II rôznymi flavonoidmi

Zdroj: Lindahl a Tagesson. CH. 1997

Inhibícia PLA₂-I a PLA₂-II rôznymi flavonoidmi. Flavonoidy boli inkubované s PLA₂-I z prasačieho pankreasu (▲-▲) a PLA₂-H z *Crotalus atrox* (O-O) a bola hodnotená aktivita PLA₂. Hodnoty sú priemer ± SD zo 4 stanovených výsledkov.

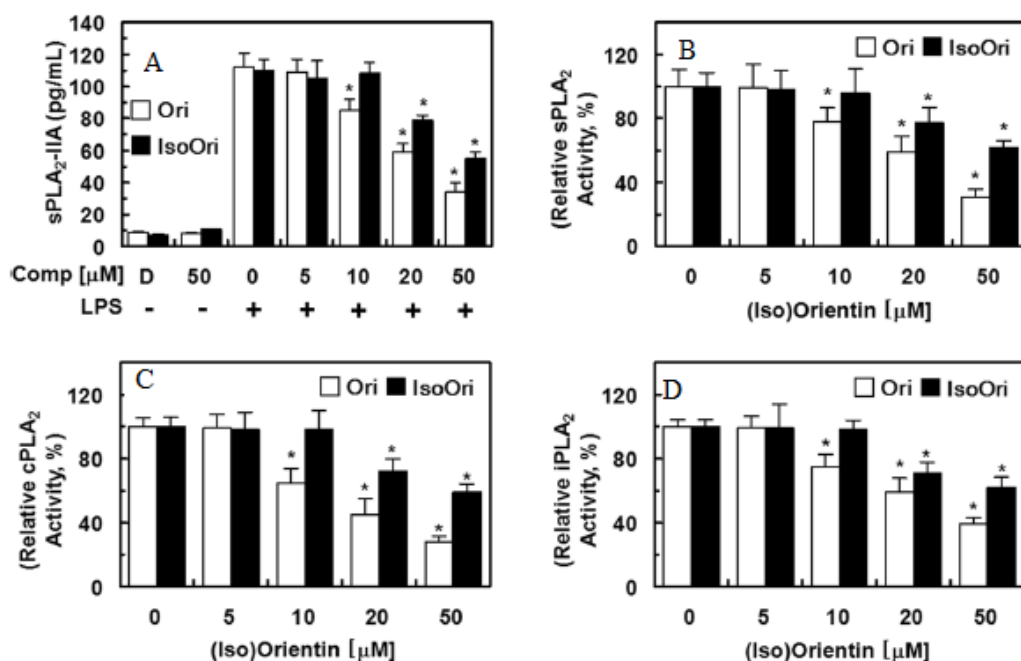
V štúdií Bae (2015) bol skúmaný vplyv dvoch glykozidov zo skupiny flavonov, orientínu a izoorientínu (Obr.27), na expresiu a aktivitu sPLA₂-IIA *in vitro* a *in vivo*.



Obrázok 27 Chemická štruktúra orientínu a izoorientínu

Zdroj: Bae, 2015

Ako orientín tak izoorientín v koncentráciách 20 - 50 μM znížili LPS -indukovanú sPLA₂-IIa a expresiu sPLA₂-II (Obr. 28 A, B). Okrem toho, orientín a izoorientín inhibovali aktivitu v závislosti od koncentrácie sPLA₂-IIa obe látky boli účinné už od koncentrácie 10 μM (Obr. 28 C, D) (Bae, 2015).



Obrázok 28 Efekt orientínu a izoorientínu na expresiu a aktivitu sPLA₂-IIA

A: HUVEC boli inkubované s orientínom a izoorientínom po dobu 6 hod. Následne boli bunky inkubované s kontrolným médiom po dobu 24 hodín a potom sa merala hladina exprese sPLA₂-IIa v kultivačnom médiu. B-D účinky zlúčenín na aktivity sPLA₂-IIa (B), cPLA₂ (C) a iPLA₂ (D) Zdroj: Bae, 2015

Na základe týchto štúdií môžeme konštatovať, že testované flavonoidy majú účinok či už na aktivitu cystolickej fosfolipázy A₂ alebo na jej expresiu. Jediný genistein ireverzibilne inhiboval tento enzým a všetky ostatné flavonoidy mali reverzibilný účinok na PLA₂ - IIA. Rutín mal okrem toho aj účinok aj na PLA₂ - IA aj keď nie veľmi veľký (max 40%).

Porovnaním dostupných štúdií možno konštatovať, že niektoré flavonoidy môžu pravdepodobne ovplyvniť PLA₂ v klinických podmienkach (Tab. 16). Jedná sa o isoflavonoid genistein, flavony baikalín, baikaleín, wogonín, orientín a izoorientín, ktoré sú schopné inhibovať tento enzým v mikromolárnych koncentráciách. Naopak u flavonolov je inhibícia vysoko nepravdepodobná v klinicky dosiahnuteľných koncentráciách.

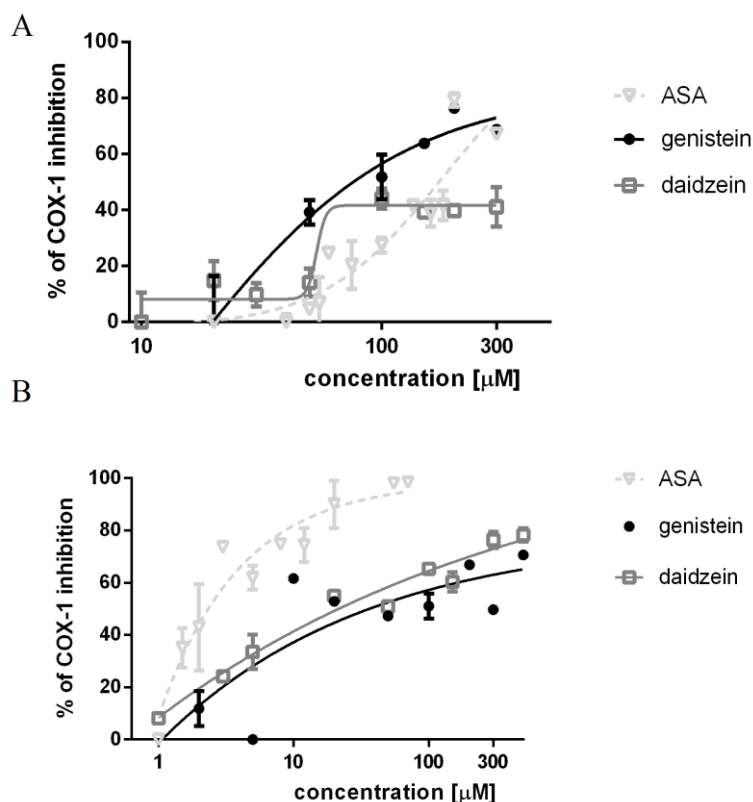
Tabuľka 16 Priama inhibícia fosfolipázy A₂ rôznymi flavonoidmi

Flavonoid	Použitá koncentrácia	Enzým	Autor
Genistein	21 µM	sPLA	<i>Dharmappa et al 2009</i>
Baikalin, baikalein, wogonin	5-20 µM	sPLA ₂ - IIA	<i>Ku, et al. 2015</i>
Rutin	1-4 mM	PLA ₂ – II; PLA ₂ - I	<i>Lindahl a Tagesson, 1997</i>
Myricetin, kvercetin, apigenin	1-4 mM	PLA-I; PLA-II	
Orientin, izoorientin	10 µM	sPLA ₂ – IIA; sPLA ₂ - II	<i>Bae, 2015</i>

Zdroj: vlastné spracovanie podľa výsledkov štúdií

4.4 Vplyv na COX

COX je enzým prítomný v mnohých typov buniek. COX-1 je konštitutívny enzým cyklooxygenázy, ktorý sa podieľa na udržiavaní homeostázy za bežných podmienok a v raných fázach zápalovej reakcie. Indukovateľná cyklooxygenáza COX-2, je zapojená v neskorších fázach zápalovej reakcie, kedy sa začína vývoj imunitnej odpovede. COX-1 je konštitutívne exprimovaný v krvných doštičkách, ako aj v neurónoch, astrocytoch a mikroglia buniek (Morel et al. 2016). Vo výskume Karličková et al. (2016) boli testované flavonoidy pre ich efekt na inhibíciu ovčej COX-1 najprv testovanej v koncentrácií 100 µM a porovnávané s ASA. ASA dosiahla cca 30% inhibície pri koncentrácií 100 µM, izoflavonoidy genistein a daidzein boli účinnejšie inhibítory kým všetky ostatné flavonoidy boli inaktívne. Vzhľadom na tieto prekvapujúce výsledky bolo opakované testovanie ASA a aktívnych izoflavonoidov v ľudskej krvi. Genistein bol viac účinný v nižšej koncentrácii, ale porovnateľné s ASA vo vyššej koncentrácii (Obr. 29A). V tomto prípade daidzeinu, bola prahová hodnota efektu okolo 40 %. Vo fyziologických podmienkach ASA ukázala skvelý efekt v jednotkách µM a úplne inhibovala COX-1 vo vyššej koncentrácii. Obidve izoflavonoidy boli menej aktívne, nedosiahli plnej inhibície ani pri vysokých koncentráciách, ale ich aktivita v jednotkách µM môže mať klinický význam (Obr. 29).

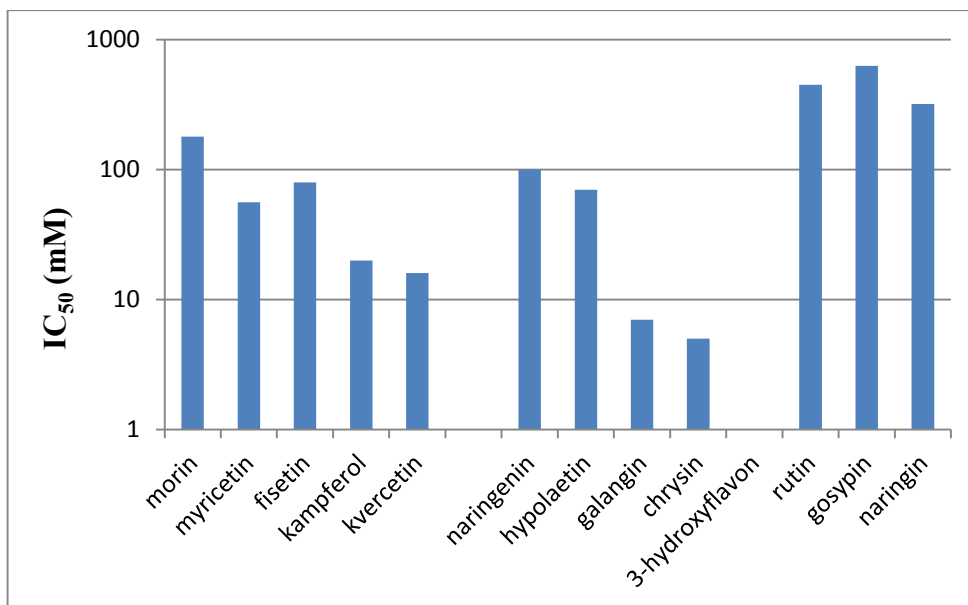


Obrázok 29 Účinok flavonoidov a ASA na COX

Zdroj: Karličková et al. 2016

Vo výskume Gryglewski et al. 1987 sa ukázalo, že kvercetin v koncentrácii 10 µM a rutin v koncentrácii 100 µM dokonca aktivovali COX zo semenných vačkov barana zatiaľ čo katechin /(+)-3-cyanidol/ a 3-O-metylkatechin (mediadolol) ju slabo inhibovali ale s IC_{50} v rádu 1 mM. Vypočítaná efektívna maximálna koncentrácia v plazme týchto flavonoidov je približne 0,05 a 0,03 µM. Kyanidol a mekiadonol nemali ale ani v dávke 10 µM antiagregačné účinky.

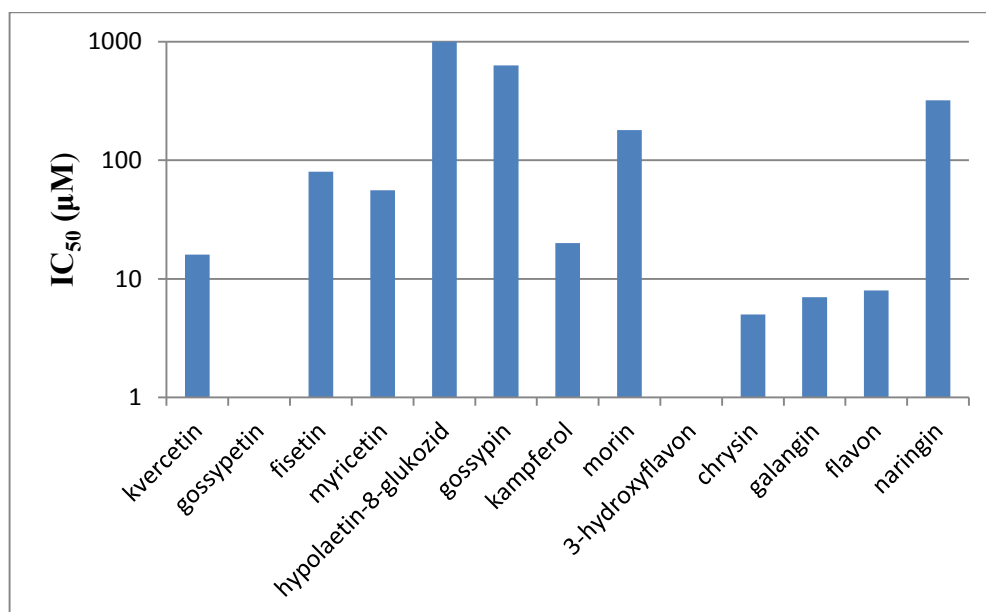
Vo výskume Moroney et al. 1998 bolo porovnávaných 17 flavonoidov (glykozidové, aglykóny) na inhibíciu leukocytárnu COX z potkana (Obr. 30). Najúčinnnejšie boli flavonoidy s OH skupinou na B kruhu v polohe 3, 5, 7. IC_{50} galanginu a chrysinu sa pohybovali dokonca pod 10 µM. Glykosidy boli oveľa menej, pokiaľ vôbec, účinné.



Obrázok 30 Porovnanie IC₅₀ na inhibíciu potkanu COX z leukocytov

Zdroj: *Vlastné spracovanie podľa výsledkov Moroney et al. 1988*

V podobnom výskume Laughton et al. (1991) boli sledované flavonoidy a ich schopnosť inhibovať cyklooxygenázu v potkaních leukocytoch. Niekoľko flavonoidov preukázalo aktivitu inhibovať COX u potkanov. Táto štúdia pozorovala inhibíciu 5-lipooxygenázy ako COX selektívne sa ukázali flavonoidy, ktoré majú na svojom skelete 1,2 alebo 3 OH skupiny. Skvelé inhibičné účinky na COX vykázali 3-hydroxyflavon a flavony chrysin, galangin rovnako ako základný flavon. Tieto látky mali IC₅₀ pod 10 μM (Obr. 31).



Obrázok 31 Inhibícia eikosanoidovej syntézy flavonoidmi

Zdroj: *Laughton et al. 1991*

V ďalšej štúdií boli tieto flavony ďalej preverované na ich schopnostiach inhibovať COX-1 i COX-2 (Obr. 32). Chrysin v koncentracii 100 μM mal percentuálnu inhibíciu na produkciu COX-1 menej ako 70%. Luteolín bol menej aktívnym inhibítorom (menej ako 50%). Flavonoidy boli menej aktívne. Chrysin bol najviac aktívny na COX-1. Naopak apigenin, chrysoeriol a diosmetin neboli vôbec aktívne. Indometacín v koncentracii 1 μM bol použitý ako pozitívna kontrola a predstavoval aktivitu $91,8 \pm 3,2\%$. Pri inhibícii produkcie COX-2 diosmetin a luteolín boli aktívne, s percentuálnou inhibíciou $56,9 \pm 6,1$ a $56,4 \pm 6,9$. Celecoxib (5 μM) bol použitý ako pozitívna kontrola a mal aktivitu $72,8 \pm 2,9\%$ (Ribeiro et al. 2015).

Compounds	R1	R2	R3	Inhibition (%) \pm SEM		COX-1 / COX-2 Ratio
				COX-1	COX-2	
4a Chrysin	H	H	H	67.4 \pm 5.5	34.0 \pm 4.0	2.0
4c Apigenin	H	OH	H	NA	45.2 \pm 4.8	-
4e Luteolin	OH	OH	H	33.5 \pm 7.9	56.4 \pm 6.9	0.6
4f Chrysoeriol	OMe	OH	H	NA	35.6 \pm 2.5	-
4g Diosmetin	OH	OMe	H	NA	56.9 \pm 6.1	-
4h	OMe	OMe	H	44.6 \pm 7.2	NA	-
5b (\pm)-Eriodictyol	OH	H	-	NA	25.5 \pm 5.0	-

Obrázok 32 Inhibícia ľudských COX-1 a COX-2

Bola použitá koncentrácia 100 μM a výsledky sú vypočítané ako priemerná hodnota z troch meraní. COX bola od zdravých dobrovoľníkov. NA-neaktívne. Zdroj: Ribeiro et al. 2015

Na základe týchto šúdií môžeme konštatovať, že medzi najúčinnejšie testované flavonoidy patria genistein, daidzein, luteolín, chrysin, kempferol, morín, kvercetin a rutín (Tab. 17). Avšak ani jeden z nich nevykazoval inhibičnú aktivitu viac ako 80%.

Tabuľka 17 Prehľad najúčinnějších flavonoidov na inhibíciu COX

Flavonoid	Koncentrácia (μM); účinnok alebo IC_{50}	Biologický materiál	Autor
Genistein, daidzein	100; 40%	<i>Ľudská krv</i>	<i>Karličková et al. 2016</i>
Kvercetin; rutín	IC_{50} -9,4; IC_{50} -71,9	<i>COX zo semných vačkov barana</i>	<i>Gryglewski et al. 1987</i>
Rutin, gosypin	IC_{50} -450; IC_{50} -630	<i>Krysie leukocyty</i>	<i>Moroney et al. 1998</i>
Naringin; morin	IC_{50} -320; IC_{50} -180		
3-hydroxyflavon; chrysin	IC_{50} -1; IC_{50} -5	<i>Krysie leukocyty</i>	<i>Laughton et al. 1991</i>
Galangin; naringin	IC_{50} -7; IC_{50} - 320		
Chrysin, luteolin	1,25-100; 70% a 50%	<i>Ľudská krv</i>	<i>Ribeiro et al. 2015</i>

Zdroj: Vlastné spracovanie podľa výsledkov štúdií

4.5 Vplyv na Tx-syntázu

Druhý krok z kaskády kyseliny arachidonovej je premena prostaglandínu H_2 na tromboxan A_2 prostredníctvom tromboxan syntázy. Tromboxan syntáza sa javí ako zaujímavý cieľ, pretože nemáme lieky, ktoré by ju inhibovali a používali by sa v klinickej praxi. Flavonoidy sa ale práve nejavia ako látky, ktoré by tento enzým inhibovali.

V recentnej štúdií Karličková et al. (2016) bolo testovaných celkom 26 flavonoidov na inhibíciu Tx-syntázy v ľudskej krvi. Ich účinky boli porovnávané so známym experimentálne používaným inhibítorom 1-benzylimidazolom. V koncentrácií 100 μM iba 3 flavonoidy ukázali viac ako 25% inhibície, ale všetky z nich boli zreteľne menej účinné ako 25 μM 1-benzylimidazol. Tieto čiastočne aktívne hydroxyflavony, apigenin a epikatechin, boli taktiež testované. Z týchto dát bolo jasné, že všetky 3 flavonoidy boli podobne aktívne a boli schopné výrazne blokovat' enzým v koncentrácií, ktorá nie je farmakologicky relevantná, a boli menej účinné v porovnaní s 1-benzylimidazolom.

4.6 Vplyv na Tx-syntázu / COX

Existujú aj nejaké štúdie, ktoré testovali produkciu thromboxanu po podaní arachidonovej kyseliny, nemožno teda určiť, či ide o vplyv na thromboxan-syntázu alebo cyklooxygenázu. V štúdií Corvazier a Maclouf (1985) bola porovnaná tvorba thromboxanu po prídavku trombínu alebo AA. Výsledky boli prakticky totožné lebo nebol žiaden veľký rozdiel v IC_{50} medzi AA a trombinom (Tab. 18) Naringin, rutinoz, floridzin nemali žiaden detekovaný efekt až v koncentrácií 1000 μ M. Rutin bol menej aktívny ako ostatné flavonoidy. Jediné čiastočne účinné flavonoidy boli flavon a kvercetin. Kvercetin bol viac účinný a dosiahol IC_{50} okolo 50 μ M (Corvazier a Maclouf, 1985).

Tabuľka 18 Efekt flavonoidov na metabolizmus AA v ľudských krvných doštičkách

Compound added	IC_{50} for thromboxane B_2 formation (μ M \pm S.D.) ($n = 3$)	
	Thrombin (0.5 U/ml)	C20:4 (40 μ M)
Rutin	> 1000	> 1000
Rutinose	*	*
Catechin	450 \pm 120	200 \pm 120
Morin	400 \pm 70	400 \pm 100
Phloretin	300 \pm 50	175 \pm 120
Phloridzin	*	*
Naringenin	200 \pm 57	175 \pm 50
Naringin	*	*
Flavone	70 \pm 12	80 \pm 15
Quercetin	55 \pm 21	44 \pm 47

Zdroj: Corvazier a Maclouf, 1985

V inej práci podľa You et al. 1999 nebol ale účinok kvercetinu na ovplyvnenie produkcie TxB_2 po podaní AA vôbec detekovaný. Všeobecne v tejto práci bola inhibícia produkcie thromboxanu minimálna (Tab.19). Apigenín vykázal slabú inhibíciu (10 %) COX. Isoflavonoidy, daidzein a tektorigenin, slabo inhibovali COX menej ako 20 %.

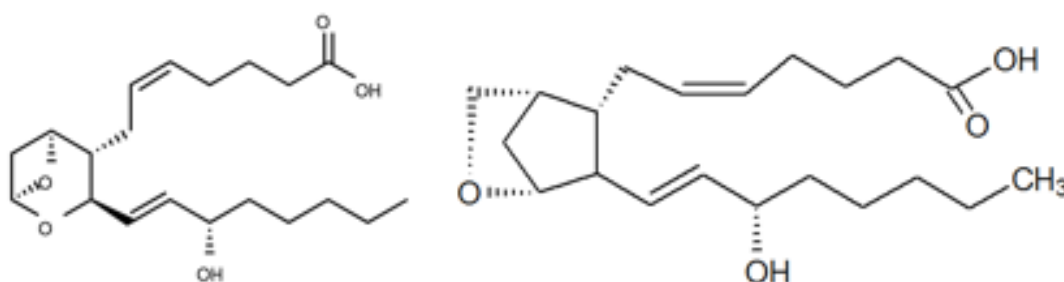
Tabuľka 19 Efekt flavonoidov na COX/LOX

	% Formation of TXB ₂ ^b	% Formation of 12-HETE ^b
Control	100.0±10.1 ^c	100.0±10.4 ^d
Indomethacin	24.0±4.6*	110.4±17.5
NDGA	49.3±8.6*	19.1±1.9*
Flavones		
Apigenin	89.6±10.1	95.0±11.5
Wogonin	104.7±4.0	82.8±7.7
7-O-methylwogonin	102.7±9.3	87.0±7.5
Chrysin	105.5±6.7	82.3±10.6
Baicalein	104.0±9.7	35.8±4.0*
Oroxylin A	91.0±10.5	42.2±3.3*
Sb-1	132.2±14.6	117.2±6.4
Skullcapflavone II	98.3±6.4	106.5±4.0
Isoflavones		
Daidzein	84.3±9.5	86.6±9.3
Tectorigenin	82.2±12.5	117.5±4.2
Iristectorigenin A	105.7±3.7	90.0±7.0
Flavonols		
Quercetin	122.4±10.4	67.1±9.1*
Vitexicarpin	127.0±14.1	114.5±7.8

Zdroj: You et al. 1999

4.7 Vplyv na Tx- receptory

Posledná dobre známa časť agregáčnej kaskády je aktivácia tromboxánového A₂ receptoru. Tromboxánový A₂ receptor, ktorého účinky na krvné doštičky, a na iné cieľové bunky, sú sprostredkované interakciou so špecifickými transmembránovými receptormi spojenými s G-proteínom. Pre analýzu účinku na tejto úrovni nemožno použiť endogenný thromboxan A₂ vďaka jeho poločasu, ale používa sa jeho stabilný analóg U-46619 (Obr. 33).



Obrázok 33 Chemická štruktúra Tx-A₂ (vľavo) a U-46619 (vpravo)

Zdroj: vlastné spracovanie

V štúdií Karlíčková et al. (2016) boli testované rôzne flavonoidy až po koncentráciu 300 μM. Ak nebola dosiahnutá inhibícia agregácie ľudských krvných doštičiek pri tejto vysokej koncentrácii boli zlúčeniny považované za neaktívne. Vzhľadom k ich aktivite boli flavonoidy rozdelené do 4 tried (Tab. 20).

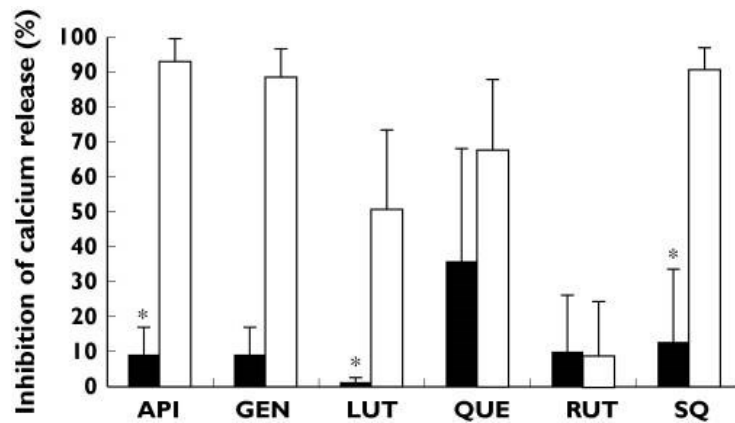
Aktivita flavonoidov bola porovnávaná podľa dvoch kritérií: IC₅₀ a efekt v koncentrácii 100 μM, pretože ich antiagregačné krivky mali iné tvary.

Tabuľka 20 Triedenie flavonoidov podľa ich schopnosti inhibovať agregáciu indukovanú tromboxánovým receptorom

Trieda	Efekt	Flavonoid
Neúčinný	Žiaden efekt pri 300μM	Baikalein, baicalin, flavon, hesperidin, hesperetin, 3-hydroxyflavon, 5-hydroxyflavon, negletein, luteolin, rutin, mosloflavon, naringin, taxifolin, troxerutin
Nepatrne účinný	Efekt pri 300μM, ale žiaden efekt pri 150μM	Kempferol, myricetin, naringin, kvercetin
Mierne účinný	Efekt pri 150μM, ale žiaden efekt pri 100μM	Katechin, diosmin, epikatechin, chrysin, genistin, morin
Účinný	Efekt pri 100μM	Apigenin, daidzein, genistein, 7-hydroxyflavon

Zdroj: Karličková et al. 2016

Pri ďalšej analýze bol skúmaný účinok flavonoidov na trombínom indukované uvoľňovanie vápnika v krvných doštičkách ošetrovaných ASA. Uvoľňovanie [Ca²⁺]_i bola pozorovaná od všetkých testovaných zlúčenín. Stimulácia doštičiek s U-46619 v prítomnosti EGTA (etylen glykoltetraoctová kyselina) malo za následok rýchle 10-násobné zvýšenie koncentrácie Ca²⁺ v krvných doštičkách (Obr. 34).

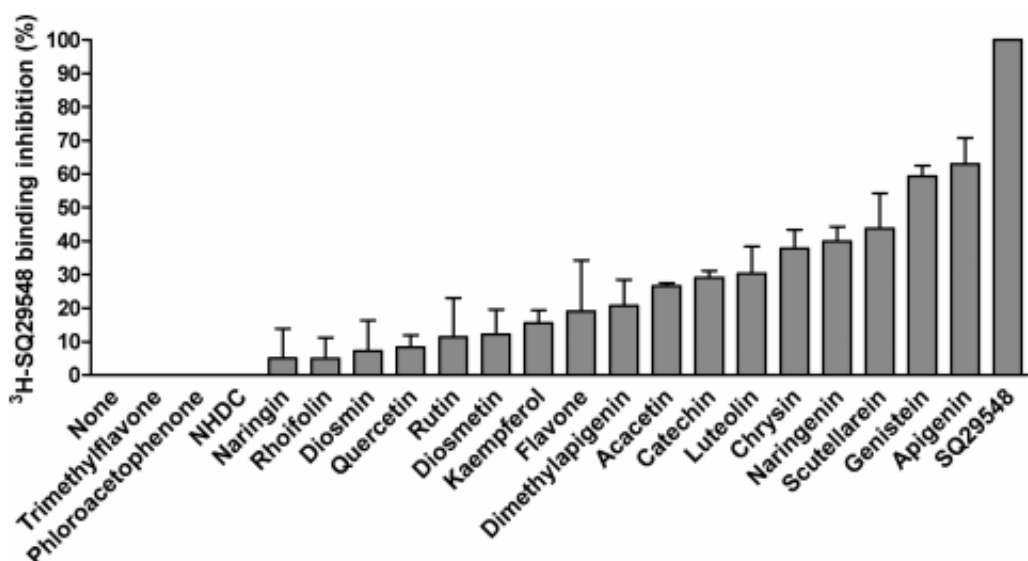


Obrázok 34 Vplyv flavonoidov na U46619- a trombínom indukované uvoľňovanie $[Ca^{2+}]_i$

Zdroj: Guerrero et al. 2007

Prázdne stĺpce predstavujú U46619-aktivované krvné doštičky; čierne pruhy ukazujú trombínovú stimuláciu aspirínom ošetrovaných krvných doštičiek; SQ- stabilný syntetický TP antagonista.

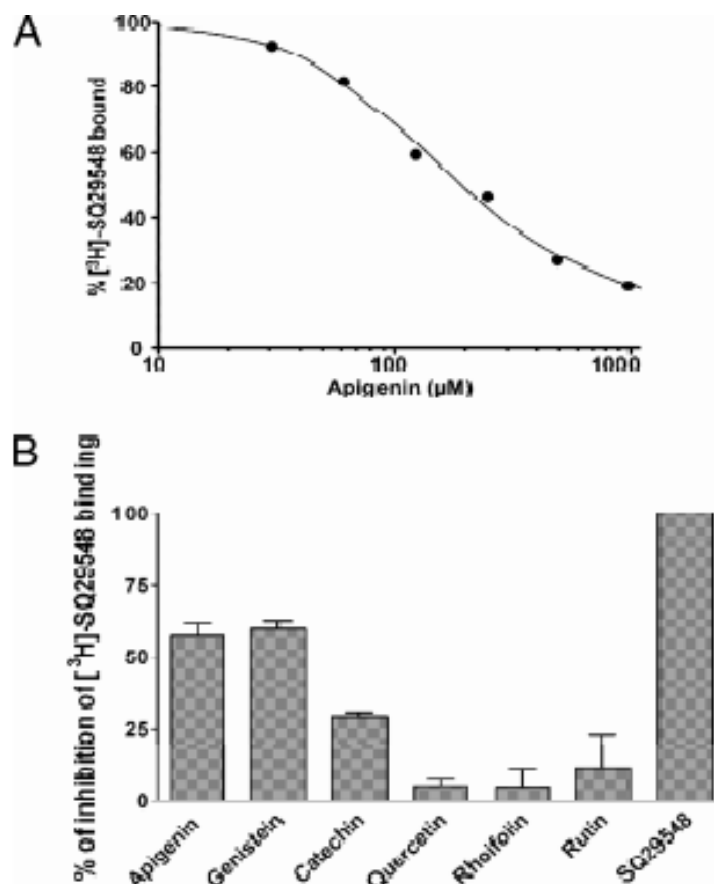
V štúdií Navarro - Nunez et al. (2009) študovali inhibičné účinky 20-tich rôznych flavonoidov v koncentrácií 250 μ M na väzbu SQ29548 (stabilný syntetický TP antagonista) ľudských krvných doštičiek. Poradie inhibičnej sily bolo apigenin = genistein > skutelarein > naringenín > chrysin > luteolín = katechín = acacetin > dimetylapiogenin = flavon > kampferol > diosmetin = rutin > kvercetin = diosmin > roifolin = naringin. Trimetylflavon, neohesperidín dihydrochalkon a floroacetofenon nepreukázali inhibičný účinok (Obr. 35).



Obrázok 35 Efekt flavonoidov na inhibíciu väzby syntetického TP na krvné doštičky

Účinok flavonoidov na $[3H]$ -SQ29548 viažucich sa na krvné doštičky v plazme bohatej na krvné doštičky. Krvné doštičky ($150 \times 10^9 / l$) boli inkubované s 5 nM $[3H]$ -SQ29548 v neprítomnosti alebo prítomnosti rôznych flavonoidov (250 μM), alebo s 0,4% DMSO ako kontrola po dobu 30-tich minút. Výsledky sú vyjadrené ako percentuálna špecifická inhibícia $[3H]$ -SQ29548, vzhľadom na to, že 100% inhibícia bola dosiahnutá v prítomnosti 10 μM SQ29548. Graf predstavuje priemer SD troch pokusov. NHDC: neohesperidín dihydrochalkon. Zdroj: Navarro - Nunez et al. 2009

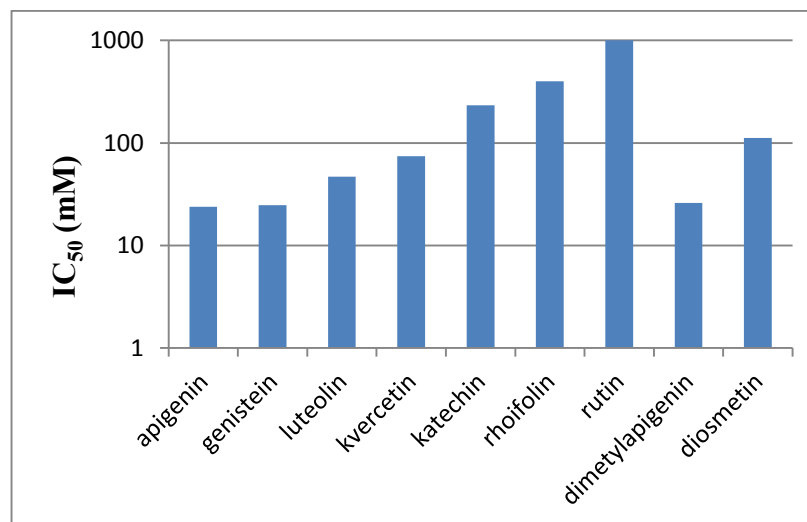
Rovnakí autori už v predchádzajúcej štúdií poukázali na schopnosť flavonoidov viazať sa na TxA_2 receptor, respektíve inhibovať väzbu stabilného analógu tromboxanu A_2 SQ29548. Okrem účinných agonistov apigeninu a genisteinu (Obr. 36 A a vid' aj Obr. 35) testovali tiež kvercetin, ktorý sa ale ukázal ako zanedbateľný v súťaži o tromboxánový receptor (Obr. 36 B). Glykozylované flavonoidy, ako napríklad roifolin mal výrazne nižšiu schopnosť viazať sa na TxA_2 oproti neglykozylovanému flavonoidu apigeninu (Navarro - Nunez et al. 2008).



Obrázok 36 inhibícia TxA_2 flavonoidmi

Účinok flavonoidov na väzbu $[3H]$ - SQ29548 na PRP. PRP boli inkubované s $[3H]$ - SQ29548 (5 nM) v prítomnosti zvyšujúcich sa koncentrácií apigeninu (A) alebo fixnej koncentrácie odlišných flavonoidov (250 μ M) ako konkurentov (B). Dej je zobrazený na paneli A a je to reprezentatívny príklad výsledkov krivky závislej od dávky a špecifickej väzby apigeninu (N=3). Panel B predstavuje percentuálnu špecifickú inhibíciu $[3H]$ - SQ29548. Výsledky sú priemerom 3 pokusov. Zdroj: Navarro - Nunez et al. 2008

V štúdií Guerrero et al. (2004), bolo pozorované, že krátka inkubácia doštičiek s niektorými flavonoidmi spôsobila inhibíciu agregácie závislú na koncentrácii. Apigenin a genistein sa správali ako silní inhibítory agregácie navodenej analógom tromboxanu A₂ v koncentráciách nižšej ako 50 μ M. Luteolín a kvercetin boli menej účinné. Diosmetin mal IC₅₀ nad 100 μ M, katechin dokonca nad 200 μ M a rhoifolín dokonca 400 μ M zatiaľ čo rutin nebol až do testovanej koncentrácie 1 mM vôbec účinný (Obr. 37).

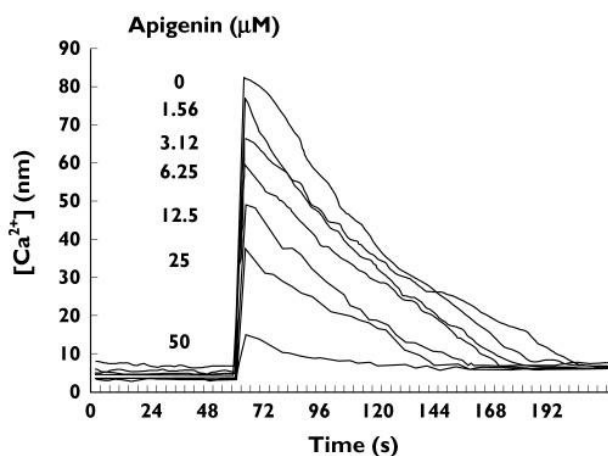


Obrázok 37 Inhibícia krvných doštičiek vyvolaná U - 46619

Zdroj: vlastné spracovanie výsledkov Guerrero et al. 2004

V testovaní Guerrero et al. (2007) si kládli za cieľ preskúmať, či flavonoidy zasahujú do TxA₂ receptoru doštičiek signálnej dráhy bunky. Najprv bol posudzovaný ich vplyv na mobilizáciu vápnika po selektívnej stimulácii TP (špecifický membránový receptor) doštičiek. Stimulácia doštičky s 2 μ M U46619, v prítomnosti 2 mM EGTA, aby sa zabránilo agregácii a prílivu extracelulárneho vápnika, malo za následok rýchle až 10-násobné zvýšenie koncentrácií vápnika vo vnútri doštičiek. Flavon, apigenin, znížil uvoľnenie vápnika v závislosti od koncentrácie (Obr. 38). Za týchto experimentálnych podmienok, ostatné testované flavonoidy, ako je napríklad genistein, luteolín a kvercetin sa tiež správali ako inhibítory mobilizácie vápnika iniciované U46619 s koncentraciou medzi 10 a 30 μ M zobrazujúci zníženie hodnoty na polovicu.

V porovnaní s týmito zlúčeninami, rutinou, glykozylovaná časť kvercetínu, vykazuje zanedbateľný účinok aj pri veľmi vysokej koncentrácii.



Obrázok 38 Dávково závislá inhibícia uvoľnenia vápnika apigeninom

Zdroj: Guerrero et al. 2007

Vo všetkých štúdiách boli sledované flavonidy apigenin a genistein, ktoré vo všetkých štúdiách mali antagonistický efekt na Tx. Ich výsledky su zhrnuté v nasledujúcej tabuľke (Tab. 21).

Tabuľka 21 Porovnanie účinkov apigeninu a genisteinu jednotlivých štúdií

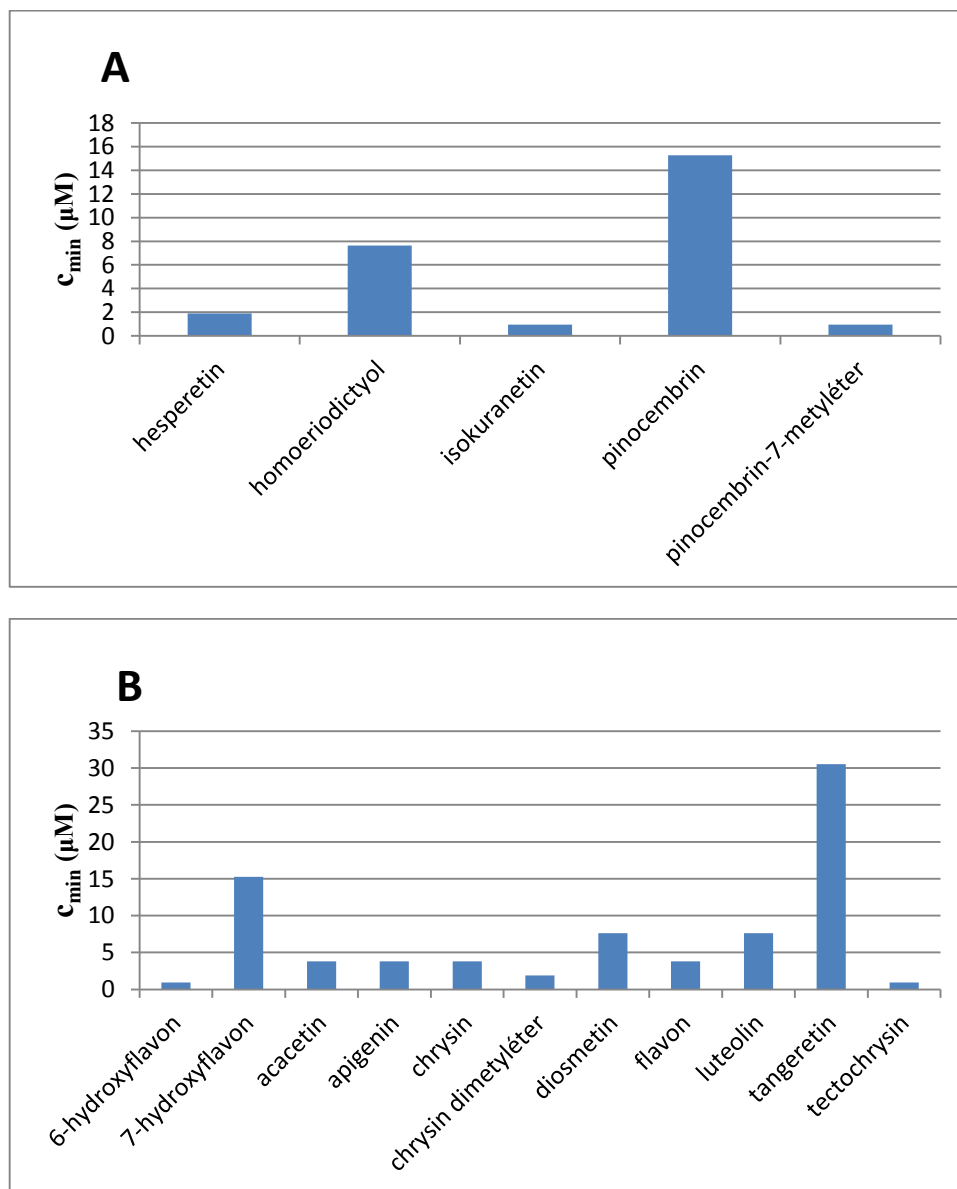
Zlúčenina	Koncentrácia μM	PRP/premyté	Použitá finálna koncentrácia U46619	Inhibícia áno/nie	Autor
Apigenin	100	PRP	0,75-1,5 μM	áno	<i>Karličková et al.2016</i>
Daidzein					
Genistein					
Apigenin	20	premyté	2 μM	áno	<i>Guerrero et al.2004</i>
Genistein					
Apigenin	250	PRP	5nM (2008) 10 μM (2009)	áno	<i>Navarro-Nunez et al.2008 a 2009</i>
Genistein					

Zdroj: vlastné spracovanie podľa štúdií

4.8 Agregácia iniciovaná ADP

ADP bola prvou preukázanou molekulou, ktorá stimuluje agregáciu doštičiek. Je obsiahnutý v granulách krvných doštičiek, a je uvoľnená po prvej aktivácii krvných doštičiek na miestach poškodenia a aktivuje ďalšie doštičky a stabilizuje agregáty. Aktivácia receptora zohráva rozhodujúcu úlohu pri uľahčovaní odpovedí s inými agonistami (Smyth et al. 2009).

Vo výskume Bojić et al. (2009) bol testovaný súbor tridsiatich flavonoidov. Kde klopidoogrel, antagonistu ADP - receptora, bol použitý ako pozitívna kontrola. Krv bola použitá od zdravých dobrovoľníkov. Výsledky antiagregačných účinkov flavonoidov boli vyjadrené ako minimálna protidoštičková koncentrácia, ktorá predstavuje najnižšiu koncentráciu flavonoidov, ktorá môže významne znížiť agregáciu v porovnaní s neošetreným vzorkom. Všetky analyzované flavonoidy vykazovali antiagregačnú aktivitu MINaAC v rozmedzí od 119 nM do 122 μ M.

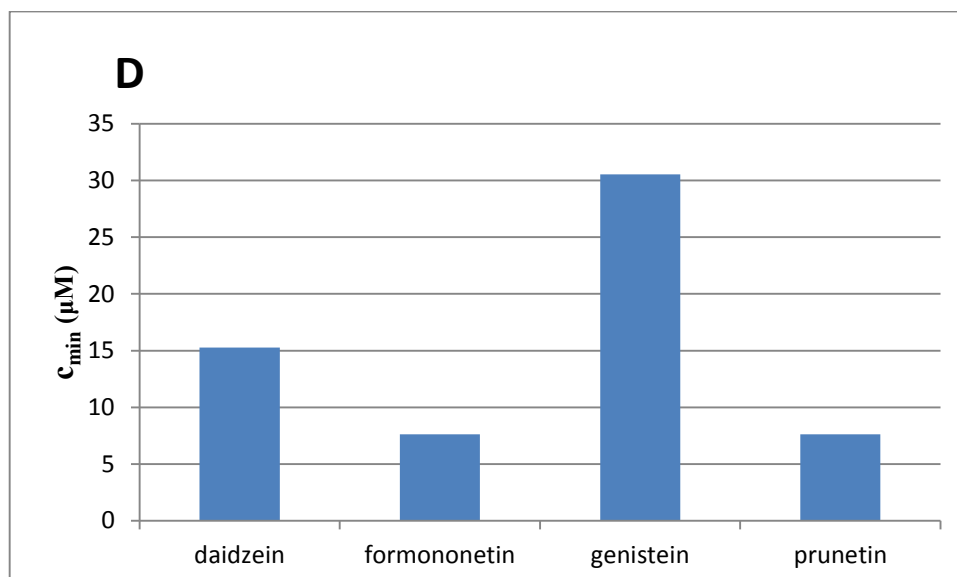
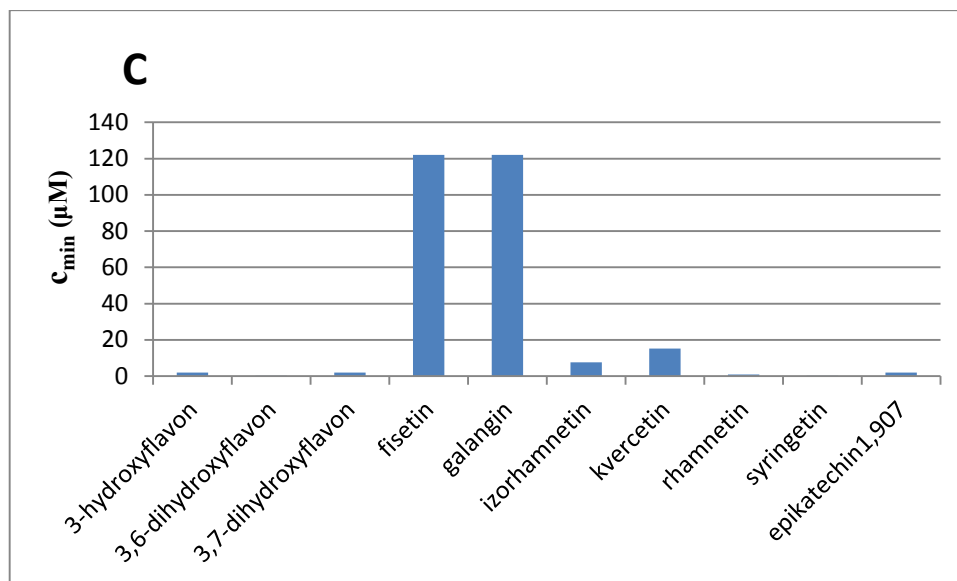


Obrázok 39 Prehľad účinkov flavonoidov na ADP

c_{MIN} : minimální koncentrácia, ktorá významne znížila agregáciu

A: p-O-metylované deriváty, B: Monohydroxylované flavony

Zdroj: vlastné spracovanie podľa výsledkov Bojić et al. 2009



Obrázok 40 Prehľad účinkov flavonoidov na ADP

C_{MIN} : minimálna koncentrácia, ktorá významne znížila agregáciu

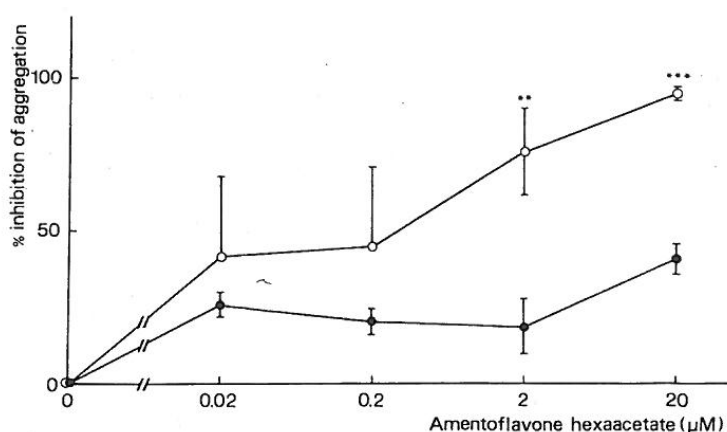
C: Monohydroxylované flavanony, D: Izoflavonoidy

Zdroj: vlastné spracovanie podľa výsledkov Bojić et al. 2009

Aj keď výsledky klopidozrelu sú porovnateľné s výsledkami najsilnejších flavonoidov 3,6-dihydroxyflavonu a syringetinu, malo by to byť interpretované opatrne. Klopidozrel je prekursor, ktorého metabolická aktivácia do istej miery môže nastať *in vitro*, ktorého hlavný enzým zodpovedný za aktiváciu, CYP2C19, prítomný v rôznych tkanivách, vrátane krvi. Získané výsledky ukazujú, že dokonca aj denná spotreba flavonoidov môže ovplyvniť agregáciu krvných doštičiek.

V inej práci neinhibovali ľudskej plazme obohatenej krvnými doštičkami apigenin, kvercetin, morin agregáciu doštičiek indukovanú ADP. Myricetin inhiboval ADP-indukovanú agregáciu o 21 %. Agregácia v premytých doštičkách bola významne inhibovaná flavonoidmi okrem apigeninu. Táto štúdia ukázala, že flavonoidy inhibovali premyté krvné doštičky veľmi silno, ale mali menší alebo žiaden efekt v plazme bohatej na krvné doštičky. Myricetin bol najúčinnjším inhibítorom agregácie krvných doštičiek (Kelly et al. 1996).

Amentoflavon hexaacetát inhiboval agregáciu ľudských krvných doštičiek indukovanú ADP. Je zaujímavé, že dosiahol tohto inhibičného účinku už pri 20 nM ale zvyšovaním jeho koncentrácie až do 2 µM skôr poklesol a iba ľahko stúpol pri koncentracii 20 µM. Inhibícia ADP indukovanej agregácie navodená týmto flavonoidom bola potencovaná nízkou koncentráciou (20 nM) PGE₁ (Obr. 41) (Beretz et al. 1986).



Obrázok 41 Efekt inhibičnej aktivity amentoflavonu na ADP- indukovanej agregácie

O - PGE₁; ● - tlmivý roztok. Zdroj: Beretz et al. 1986

V testovaní Beretz et al. (1983) flavonoidy inhibovali agregáciu premytých ľudských krvných doštičiek a sekréciu serotonínu spôsobené ADP. Taktiež inhibovali aktivitu 3,5-cyklickej AMP fosfodiesterázy. V tejto štúdií je poukazané nato, že kvercetin umožňuje antiagregčný účinok prostacyklínu. PGI₂ inhibovalo agregáciu premytých ľudských krvných doštičiek indukované 5 µM ADP. Efekt PGI₂ bol potencovaný kvercetinom. Nízka koncentrácia kvercetinu, ktorý samostatne neinhiboval agregáciu krvných doštičiek, potencovala inhibičný účinok PGI₂. Ako je znázornené v tabuľke č. 22 kvercetin v koncentracii 200 µM úplne inhiboval agregáciu krvných doštičiek.

Tabuľka 22 Inhibícia kvercetínu a PGI₂ na krvné doštičky indukované ADP

Quercetin (μM)	Aggregation (% inhibition) PGI ₂ (nM)				
	0	0.1	0.25	0.5	1
0	0	28	63	73	100
2	0	/	/	82	/
10	0	50	65	93	/
20	18	88	/	100	/
50	21	94	100	/	/
200	100	/	/	/	/

Zdroj: Beretz et al. 1983

Na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať, že účinok flavonoidov na inhibíciu agregácie indukovanú ADP závisí od koncentrácie. Ako napríklad kvercetin, ktorý v jednej štúdií v koncentrácií (2,5 mmol) sa ukázal ako presvedčivý inhibítor a v druhej štúdií pri koncentrácií 40 μM vôbec neinhiboval agregáciu krvných doštičiek v plazme. Naopak v kombinácií s PGI₂ inhiboval krvné doštičky už v koncentrácií 200 μM .

Apigenin vykazoval slabý účinok a morin nebol vôbec účinný. Epikatechin a myricetin boli taktiež účinnými inhibítormi. Tieto koncentrácie sú ale príliš vysoké aby boli dosiahnuté in vivo a majú teda klinicky zanedbateľný význam.

Tabuľka 23 Prehľad najúčinnjších flavonoidov na agregáciu indukovanú ADP

Flavonoid	Koncentrácia (μM)	Účinok (%)	Premyté doštičky/krv	Autor
Genistein, 3,6-dihydroxyflavon, syringenin	0,119-122	neuvedené	Krv	Bojic et al. 2009
Myricetin	100	21	Premyté doštičky	Kelly et al. 1996
Amentoflavon	0,02	50	Premyté doštičky	Beretz et al. 1986
Kvercetin	2-200	82 - 100	Premyté doštičky	Beretz et al. 1983

Zdroj: vlastné spracovanie podľa štúdií

4.9 Agregácia iniciovaná trombínom

Thrombin, hlavná proteáza v koagulačnej kaskáde, je najviac účinný aktivátor krvných doštičiek. Trombín interaguje s proteázou aktivovanými receptormi (PAR), na povrchu ľudských krvných doštičiek (PAR-1 a PAR-4) (Smyth, et al. 2009).

Fyziologické dôsledky inaktívácie PAR1 a PAR4 nie sú príliš známe. Bolo preukázané, že stimulácia doštičiek trombínom vedie k aktivácii fosfolipázy C, uvoľneniu vápnika, a k aktivácii proteínovej kinázy C, čo spôsobí sekréciu granúl. PAR1 sa tiež nachádza na endotelových bunkách, bunkách hladkého svalstva, fibroblastoch a srdcových bunkách, a trombínom sprostredkovaná aktivácia PAR1 na týchto bunkách môže prispievať k proliferáčnym a pro - zápalovým účinkom trombínu. Z tohto dôvodu je možné, že antagonizmom PAR1 receptora sa tlmí nielen arteriálna trombóza, ale môže tiež modulovať ďalšie trombínom sprostredkované procesy. Antiagregačný účinok flavonoidov na trombínom indukované receptory je málo preskúmaný. V jednej štúdií sa skúmal účinok 13 rôznych polyfenolických zlúčenín v koncentrácii 200 μM na agregáciu ľudských krvných doštičiek vyvolané trombínom ($0,2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$). Zo všetkých testovaných zlúčenín iba kvercetin, apigenin a genistein vykazovali významný inhibičný účinok.

Tieto látky boli ďalej testované spoločne s rutínom, vybraným ako negatívna kontrola, na dávково závislé účinky a v porovnaní thrombinom a agonistami PAR-1 a PAR-4. Kvercetin a apigenin vykazovali podobnú schopnosť narušiť PAR4, zatiaľ čo kvercetin bol mierne účinnejší na PAR1.

Pri prítomnosti genisteinu bola agregácia inhibovaná obdobne na oba PAR1 a PAR4, zatiaľ čo inhibícia vyvolaná trombínom bola menej výrazná. Ako sa dalo očakávať, rutín nevykazoval inhibujúce účinky na žiadnej z testovaných koncentrácií (Tab. 24) (Navarro - Nunez et al. 2009).

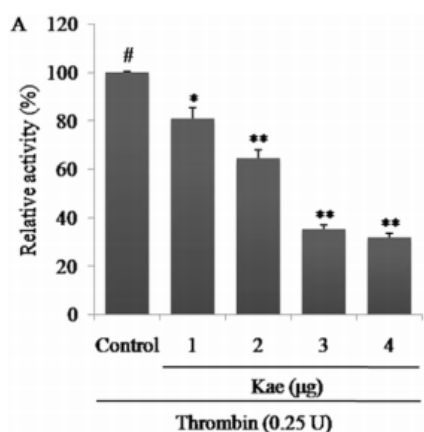
Tabuľka 24 Inhibícia agregácie navodená trombínom a agonistami jeho receptrov flavonoidmi

	Apigenin	Genistein	Quercetin	Rutin
Thrombin $0.2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$	56.4 ± 9.8	>100	37.2 ± 5.8	>100
PAR ₁ -AP $25 \mu\text{M}$	54.4 ± 5.7	56.0 ± 5.5	22.0 ± 4.2	>100
PAR ₄ -AP $150 \mu\text{M}$	20.8 ± 3.5	47.6 ± 6.5	23.1 ± 1.5	>100

Zdroj: Navarro - Nunez et al. 2009

Táto štúdia sa zamerala na účinky rôznych flavonoidov na aktiváciu krvných doštičiek vyvolanej trombínom prostredníctvom posúdenia ich účinkov na konkrétne signalizačné kaskády nadväzujúcich PAR1 a PAR4 receptory. Bolo dokázané, že tri flavonoidy, kvercetin, apigenin a genistein, inhibujú ako PAR1-AP tak aj PAR4-AP doštičiek, prostredníctvom inhibície uvoľnenia vápnika, uvoľnenie granúl a agregácie. Kým bunkový mechanizmus zodpovedný za antiagregačnú aktivitu kvercetinu, a v menšej miere apigeninu, môže byť čiastočne v dôsledku inhibície viac kináz. Mechanizmy akými PARs aktivuje signálne dráhy doštičiek neboli dostatočne definované.

V zaujímavej štúdií bola testovaná enzymatická aktivita ľudského trombínu. Enzymatické aktivity trombínu boli výrazne zvýšené v kontrolnej skupine bez kampferolu v porovnaní s skupinami liečených vehikulom. Liečba kampferolom (1, 2, 3, a 4 µg) počas 30-tich minút podstatne inhibovala enzymatickú aktivitu trombínu (20 - 68%) v porovnaní s kontrolnou skupinou, ktorá nebola liečená kampferolom (Obr. 42) (Choi et al. 2015).



Obrázok 42 Účinok kampferolu na trombín

Zdroj: Choi et al. 2015

V vyššie spomínanej štúdií (kapitola 4.6) Corvazier a Maclouf (1985) boli študované flavonoidy na ich účinok na AA alebo trombin. Výsledky týchto štúdií sú uvedené v Tab. 18. Kvercetin, genistein a kampferol mali najlepšie inhibičné účinky v týchto štúdiách.

Tabuľka 25 Zhrnutie výsledkov flavonoidov na agregáciu krvných doštičiek navodenou trombinom alebo agonistami jeho receptorov

Flavonoid	Inhibícia v % (použitá látka)	Marker	Autor
Kvercetin	22±4,2(PAR); 23,1±1,5(PAR4)	Agregácia	Navarro- Nunez et al. 2009
Apigenin	54±5,7(PAR1);20,8±3,5(PAR4)		
Genistein	56±5,5(PAR1);47,6±6,5(PAR4)		
Kampferol	20-68 (trombin)	Enzymatická funkcia trombínu	Choi et al. 2015
Kvercetin	55±21 (trombin)	Produkcia TxB2	Corvazier a Maclouf, 1985

Zdroj: vlastné spracovanie podľa výsledkov štúdií

4.10 Agregácia iniciovaná adrenalínom

Niekoľko flavonoidov izolovaných z *Cephalotaxus wilsoniana* a *Justicia* boli použité pri štúdií antiagregčných účinkov po stimulácií ľudských doštičiek v krvnej plazme bohatej na krvné doštičky adrenalínom. Ich inhibičný účinok je uvedený v Tab.26 a chemické štruktúry dvoch účinných flavonoidov v Obr. 43. Je nutné ale dodať, že lignany použité v štúdií mali lepší účinok.

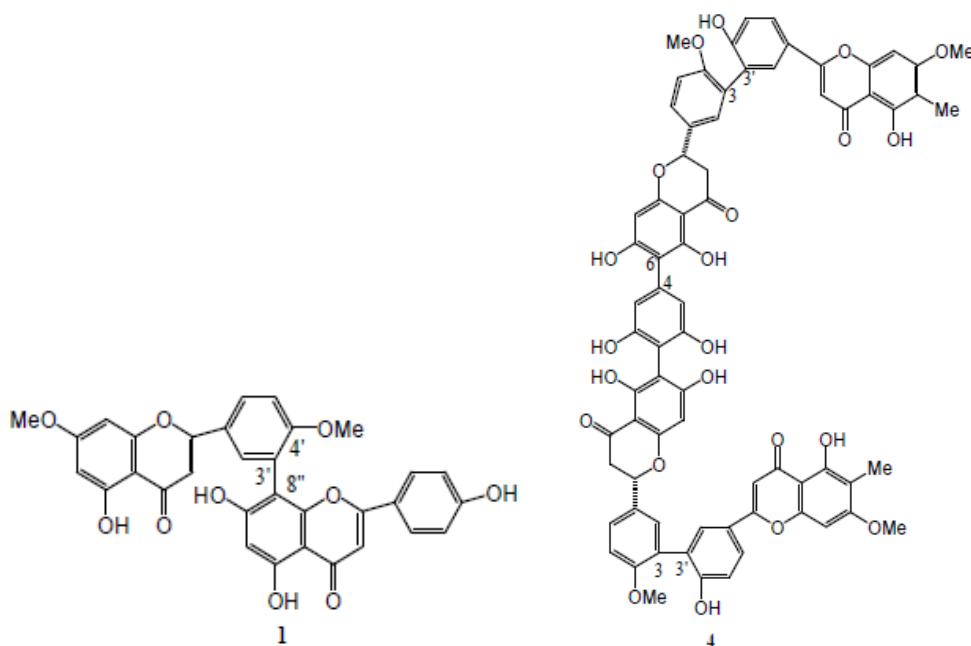
Tabuľka 26 Protidoštičkový efekt flavonoidov

Compound (µM)	Aggregation (%)
Control	98.7 ± 0.3
1 (300)	49.9 ± 3.0*
2 (300)	97.4 ± 0.8
3 (300)	98.8 ± 1.6
4 (300)	38.5 ± 1.2*
9 (100)	50.9 ± 5.3***
10 (100)	74.7 ± 2.2**
11 (100)	54.9 ± 2.0***
13 (300)	27.7 ± 11.0**
Aspirin (50)	29.5 ± 1.0*

Zdroj: Wu et al. 2007

č.1 ginkgetin, č.2 taiwanhomoflavon A, č.3 taiwanhomoflavon B, č.4 taiwanhomoflavon C, č. 9 justicidin B (lignan), č. 10 justicidin C (lignan), č. 11 justicidin D (lignan) a č. 13 prokumphthalid A (lignan).

V tejto štúdií sa zistilo, ginkgetin č. 1, taiwanhomoflavon C č. 4, inhibujú sekundárnu agregáciu vyvolanú adrenalínom v ľudskej krvi (Wu et al. 2007).



Obrázok 43 Chemické vzorce dvoch najúčinnnejších flavonoidov č.1 ginkgetin a č.4 taiwanhomoflavon C

Zdroj: Wu et al. 2007

5 Antioxidačné vlastnosti flavonoidov

V rozvinutých krajinách väčšina staršej populácie trpí kardiovaskulárnymi chorobami. Krvné doštičky sú zapojené do hemostázy, trombózy a zápalových procesov, a preto v dôsledku fyziologických funkcií môže dôjsť k infarktu myokardu a mozgovej mŕtvice. Najčastejší liek používaný v prevencii uvedených chorôb je kyselina acetylsalicylová, zatiaľ čo antagonisti na ADP - receptoroch predstavujú ďalšiu možnosť liečby. Ani jeden z týchto liekov nie je bez vedľajších účinkov, alebo vždy účinný, a tak hľadanie nových a bezpečnejších liečiv z tejto skupiny pokračuje. Z prírodných látok, prítomných v každodennej strave, polyfenoly, najmä flavonoidy, vyzerajú ako nádejní kandidáti, pri prevencii kardiovaskulárných ochorení. Okrem vyššie spomínaných mechanizmov, môže byť protiagregačná aktivita flavonoidov pripísaná zvýšenej produkcii prostacyklínu endoteliálnymi bunkami. Prostacyklín znižuje agregáciu cez syntézu cAMP. *In vitro* inhibície COX, lipooxygenázy, thyrozin kinázy, fosfodiesterázy alebo fosfolipázy boli dokumentovaná u flavonoidov a sú spájané s ich antitrombotickou aktivitou.

Aj keď bolo analyzovaných niekoľko mechanizmov účinku, antiagregačný mechanizmus flavonoidov nebol doposiaľ vysvetlený. Existujú taktiež pochybnosti o antiagregačnom účinku pretože pri pokusoch *in vitro* boli použité vysoké koncentrácie (10 až 100 μM), ktoré nemôžu byť dosiahnuté *in vivo* po perorálnom podaní (Bojić et al. 2011).

K dispozícii je veľké množstvo dôkazov, ktoré vyplýva z epidemiologických štúdií, že dlhodobé podávanie flavonoidov môže znížiť, alebo aspoň majú tendenciu znižovať výskyt kardiovaskulárnych ochorení a ich dôsledky ako napríklad zníženie rizika srdcebného zlyhania, krvného tlaku a arytmií. Perorálne podávanie flavonoidov bola s cieľom zlepšiť zdravotný stav myši v modeli aterosklerózy a lipoproteinové spektrum diabetických krýs bez vplyvu na hladinu glukózy v krvi. Podobne boli dokumentované znížené riziko srdcebného alebo mozgového infarktu po podaní rôznych flavonoidov. Perorálne podanie flavonoidov je schopné znížiť krvný tlak u zvierat, ktoré trpia hypertenziou a nemá žiadny vplyv na krvný tlak zdravých zvierat. Tieto pozitívne účinky na zvýšený krvný tlak u zvierat nemusí byť prítomný aj u ľudí. Zriedkavé štúdie na zvieratách a ľuďoch dokumentujú aj pozitívne účinky niektorých flavonoidov na srdcové zlyhanie a zníženie arytmií (Mladěnka et al. 2010).

Flavonoidy sa označujú ako prírodné antioxidanty, ale výskum ich mechanizmov účinku, ktorými flavonoidy ovplyvňujú funkciu buniek stále viac ukazuje, že tieto zlúčeniny pôsobia selektívne na enzýmy, receptory, zložky kináz signálnych kaskád. Je pravdepodobné, že špecifické aspekty štruktúry flavonoidov, ako je počet a substitúcia hydroxylových skupín, stupeň nenasýtenia alebo glykozylácia môže mať do značnej miery vplyv na jeho mechanizmus účinku na cieľových bunkách (Guerrero et al. 2007).

Všeobecne platí, že väčší počet voľných hydroxylových skupín je zodpovedných za väčšie vychytávanie voľných radikálov, ale ich poloha vo flavanónovej kostre je veľmi rozhodujúca. Prítomnosť dvoch hydroxylových skupín v polohe orto v kruhu B je potvrdený ako najdôležitejší, aj keď priľahlé hydroxylové skupiny v polohách 5 a 6 (a 7) v kruhu A, môžu nahradiť antioxidantnú funkciu v kruhu B. 3', 4'-dihydroxyphenolová štruktúra kruhu B sa javí ako ideálna, pretože jeho interakcie s ROS molekulou môžu mať za následok pomerne stabilný radikál. Odstránenie jednej z hydroxylových skupín flavonoidov v orto polohe kruhu B výrazne znižuje ROS – antioxidantnú aktivitu (Mladěnka et al. 2010). Maximálna efektívnosť pre antioxidantný účinok zrejme vyžaduje prítomnosť 3 - OH skupín pripojených k dvojitej väzbe susediacou s karbonylovou skupinou v kruhu C (Rice-Evans et al. 1996).

Ďalšia hydroxylová skupina v kruhu B výrazne neovplyvňuje aktivitu flavonolov, ale môže zvýšiť ich účinok. Tu nastáva nezhoda medzi štúdiami pokiaľ ide o účinok 4-keto skupiny a 2,3-dvojitej väzby. Rozdiel môže byť pozorovaný prostredníctvom porovnávania kvercetinu s katechínom, ktorý sa líšia v ketoskupine a dvojitej väzby (Mladěnka et al. 2010). Kvercetin má rovnaký počet hydroxylových skupín a v rovnakých pozíciách ako katechín, ale obsahuje tiež 2,3-dvojitú väzbu v kruhu C a 4-oxo skupinu. Kyanidín s centrálnym antokyanidinovým kruhom C, má približne rovnakú antioxidačnú aktivitu ako kvercetin (Rice-Evans et al. 1996).

Predpokladalo sa, že štruktúru kvercetinu môže zlepšiť elektrónová dezlokácia vzniknutím radikálu, ale nebolo to úplne potvrdené v ďalších štúdiách (Mladěnka et al. 2010). Zachovávanie katecholovej štruktúry v kruhu B, ale odstránenie dvojitej väzby v kruhu C odstraňuje dezlokalizované elektróny z radikálu aryloxyly. Redukcia nenasýtené väzby v kruhu C z kampferolu, na dihydrokampferol, nemá žiadny vplyv na celkové antioxidačné účinky. V skutočnosti jediná skupina OH v B kruhu má zrejme prínos, a dokonca aj v spojení s konjugovaným systémom dvojitej väzby a skupina 3-OH veľmi neprispieva k antioxidačnému účinku kamferolu. Výsledky ukazujú na dôležitosť nenasýteného kruhu C a elektrónovú dezlokáciu pre stabilizáciu aryloxylovej skupiny (Rice-Evans et al. 1996).

Flavonoidy majú iba 5-hydroxylové a / alebo 7-hydroxylové skupiny, neaktívne, alebo len veľmi nepatrne. Obecne majú flavonoidy účinok na rôznych úrovniach, ktoré môžu byť dôležité pre prevenciu, respektíve liečbu kardiovaskulárnych chorôb s ohľadom na ich chemickú štruktúru. Tieto vplyvy môžu obsahovať tieto mechanizmy:

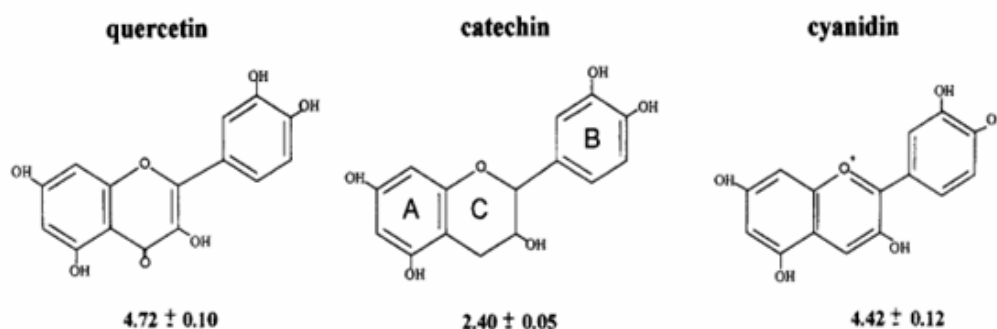
1. úbytok oxidatívneho stresu:
 - Priame odsávanie voľných radikálov (antioxidačné pôsobenie),
 - kovové interakcie (železo a / alebo med' chelace),
 - Inhibícia enzýmov produkujú ROS, najmä xantín oxidáza NADPH oxidáza, lipoxygenázy.
2. Pokles expresie zápalových signálnych molekúl:
 - Inhibícia expresie iNOS,
 - Inhibícia expresie COX-2,
 - Inhibícia aktivácie leukocytov.
3. Inhibícia zhlukovaniu krvných doštičiek.
4. Priamy vazodilatačný účinok.

Pri porovnávaní rôznych štúdií je niekoľko faktorov, ktoré sa musia brať v úvahu. Ide najmä o:

- Experimentálne médium a ROS. Je jasný rozdiel medzi ROS v hydrofilnom prostredí a peroxidácií lipidov v hydrofóbných biomembránach.
- Zapojenie dočasných kovov v produkcii ROS (Mladěnka et al. 2010).

V štúdií Rice-Evans et al. (1996) boli porovnávané 3, 5, 7, 3', 4' - pentahydroxypolyfenolické štruktúry.

Štruktúry na Obr. 44 predstavujú tri flavonoidy: kvercetin, (pentahydroxy flavonol (flavóny-3-ol)), katechín, (3-hydroxyflavan), kyanidín, (antokyanidín) s rovnakým usporiadaním piatich hydroxylových skupín.



Obrázok 44 Štruktúry flavonoidov a ich antioxidačná aktivita

Čísla pod obrázkami vyjadrujú TEAC - antioxidačný potenciál na koncentráciu látky

Zdroj: Rice-Evans et al. 1996

Na základe týchto pozorovaní, vzťah medzi aktivitou a štruktúrou flavonoidov ukazuje Tab. 27.

Tabuľka 27 Vzťah medzi antioxidačnou aktivitou a štruktúrou

Zvyšuje aktivitu	Znižuje aktivitu
Dvojitá väzba medzi C2-C3	Metylované deriváty na kruhu A,B
OH skupina v polohe C3 ↑ antiagregačnú A	Prenos kruhu B z C2 až C3
Žiadna karbonylová skupina v C4	4 a viac zvyškov v kruhu A a B
Substituent v C6 v A kruhu, O-metylácia A, B kruhu	

Zdroj: vlastné spracovanie

Nutričné aplikácie týchto informácií vyžaduje rozsiahle vyšetrovanie metabolizmu flavonoidov, systematickú analýzu potravín pre obsah flavonoidov a ich zloženie, a porovnanie antioxidačných účinkov *in vivo*. Viac ako desať rokov výskumu vzťahov medzi aktivitou a účinkom priniesla základné porozumenie farmakokinetiky flavonoidov, absorpcie a metabolizmu vo vzťahu k ich chemickej štruktúry. Dôkaz, že flavonoidné metabolity môžu byť viac či menej aktívne ako prirodzené zlúčeniny má významné dôsledky v preventívnej a terapeutickú užitočnosti týchto zlúčenín. Hoci existujúce znalosti o absorpcii a metabolizmu sú obmedzené na vybranú skupinu flavonoidov, dostatočné dôkazy podporujú, že väčšina z týchto zlúčenín sú absorbované nedostatočne. Štrukturálna heterogenita flavonoidov, ich viacnásobne mechanizmy účinku, a rôzne experimentálne metódy slúžia na vyhodnotenie ich antioxidačnej aktivity a to môže predstavovať výzvu pri ich ďalšom študovaní. Primerané uplatnenie vzťahov medzi štruktúrou a účinkom pre ľudskú výživu vyžaduje systematické porovnávanie homológov, ktoré sa líšia v jedinom štrukturálnom znaku. Hoci vzťah medzi účinkom a štruktúrou metabolitov flavonoidov si vyžaduje ďalšie výskumy, modifikácie, ktoré vznikajú pri metabolizme zahŕňajú hydroxyláciu, O-metyláciu, štiepenie heterocyklu, deglykozylace, a štiepenie polymérnych látok do monomérnych jednotiek. Vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou prirodzene sa vyskytujúcich flavonoidov, ponúkajú predbežný pohľad na dopad týchto metabolických zmien na antioxidačnú aktivitu pomocou rôznych mechanizmov (Heim et al. 2002).

6 Diskusia

V našej práci sme sa venovali hlavne protidoštičkovým účinkom flavonoidov. Flavonoidy vykazovali sľubné výsledky a sú teda sľubnými kandidátmi v budúcej protidoštičkovej liečbe. Inhibícia agregácie krvných doštičiek je reverzibilná na rozdiel od ASA, ktorá spôsobuje ireverzibilnú väzbu na COX. Predmetom mnohých štúdií bolo testovanie flavonoidov ako kvercetin, apigenin, genistein, daidzein, ktoré mali sľubné protidoštičkové účinky. Samozrejme v každej štúdií boli použité iné podmienky testovania, niekde sledovali účinky flavonoidov v plnej krvi, inde v plazme bohatej na krvné doštičky alebo premyté krvné doštičky. Rovnako aj krv nebola vždy od ľudí a tak niektoré výsledky môžu byť diskutabilné, pretože nevieme, ako by sa flavonoidy správali v ľudskom tele. Pri testovaní v niektorých štúdiách boli taktiež použité koncentrácie, ktoré boli viac ako teoretické, pretože sa pohybovali v jednotkách mM a teda v klinicky nedosiahnuteľných koncentráciách. Napriek tomu flavonoidy ukázali, že sú schopné inhibovať agregáciu krvných doštičiek a malo by sa im aj naďalej venovať. Ako rozhodujúca sa ukázala byť aj chemická štruktúra flavonoidov ich usporiadanie a počet OH skupín, dvojitá väzba a metylové skupiny.

Pri agregácii navodenej kolagénom sa kvercetin ukázal vo viacerých štúdiách ako účinný, pričom jeho inhibícia bola okolo 50% v koncentráciách od 2 μM do 8 μM . Väčšiu účinnosť nad 90% vykazoval v koncentráciách od 40 μM do 2500 μM . Na fosfolipázu A_2 sa ukázali ako aktívne genistein, baikalín, baikaleín, wogonín, rutín, kvercetin, myricetin. V koncentráciách 100 μM , daidzein, rutin, chrysin, luteolín a genistein boli účinnými antagonistami na COX. V tej istej koncentráciách apigenin, daidzein a genistein boli účinné na Tx - receptor. Najúčinnšie flavonoidy boli schopné ovplyvniť agregáciu ADP už v koncentráciách od 0,119 - 200 μM a boli to opäť genistein, myricetin, amentoflavon a kvercetin.

Flavonoidy ukázali, že majú aj antioxidačnú aktivitu, ktorá je príčinou mnohých ochorení a flavonoidy sa môžu uplatniť aj v tejto sfére.

Záver

Táto práca poskytuje pohľad na antiagregačnú aktivitu z pomerne veľkého súboru flavonoidov. Ako bolo preukázané v mnohých štúdiách flavonoidy preukázali protidoštičkový účinok rôznymi mechanizmami. Súčasná farmaceutická veda zdôrazňuje kladné vlastnosti týchto látok a odporúča zvyšovať ich príjem. Ide hlavne o krajiny, kde klimatické podnebie neumožňuje zabezpečiť príjem adekvátneho množstva prírodných polyfenolových látok.

Na trh boli uvedené rôzne výživové doplnky s obsahom flavonoidov. Sú to na jednej strane rastlinné extrakty, na druhej strane synteticky vyrobené polyfenolové zlúčeniny vo forme rôznych farmaceutických výrobkov. Tieto látky nemajú nahrádzať, ale iba doplniť nepostačujúce množstvá polyfenolových látok v ľudskej strave.

Uvedené údaje preukazujú, že prírodné bioaktívne látky z potravín môžu mať viac cieľov (inhibícia fosfolipázy A_2 , zvýšenie hladín cAMP, inhibícia tvorby TXA_2 , inhibícia COX, antagonizmus na tromboxanovom receptore) a ďalšie mechanizmy sú pravdepodobné, pretože flavonoidy sú schopné zabrániť agregácií krvných doštičiek iniciovanej aj trombinom.

Zoznam použitej literatúry

- Assefa AD, Ko EY, Moon SH, Keum YS. Antioxidant and antiplatelet activities of flavonoid-rich fractions of three citrus fruits from Korea. *3 Biotech* 2016; 6:109
- Bae JS. Inhibitory Effect of Orientin on Secretory Group IIA Phospholipase A₂. *Inflammation* 2015; 38: 1631-1638
- Beretz A, Briancon-Scheid F, Stierle A, Corre G, Anton R, Cazenave JP. Inhibition of human platelet cyclic AMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by a hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate. *Biochemical Pharmacology* 1986; 35: 257-262
- Beretz A, Stierle A, Anton R, Cazenave JP. Role of cyclic AMP in the inhibition of human platelet aggregation by quercetin, a flavonoid that potentiates the effect of prostacyclin. *Biochemical Pharmacology* 1981; 31: 3597-3600
- Bojić M, Debeljak Ž, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutrition Journal* 2011; 10:73
- Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *The Journal of Physiology*. 1963; 168: 178-195
- Campbell IM. Secondary Metabolism and Microbial Physiology. *Advances in Microbial Physiology* 1985; 25: 1-60
- Cook NC, Samman S. Flavonoids---Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1996; 7:66-76
- Corvazier E, Maclouf J. Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985; 835: 315-321
- David AVA, Arulmoli R, Parasuraman S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Reviews* 2016; 10(20): 84–89
- Dharmappa KK, Mohamed R, Shivaprasad HV, Vishwanath BS. Genistein, a potent inhibitor of secretory phospholipase A₂: a new insight in down regulation of inflammation. *Inflammopharmacology* 2009; 18:25–31
- Fuentes E, Palomo I. Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets: Food and drug interactions. *Journal of functional foods* 2014; 6: 73- 81

- Galinski CHN, Zwicker JI, Kennedy DR. Revisiting the mechanistic basis of the French Paradox: red wine inhibits the activity of protein disulfide isomerase *in vitro*. *Thrombosis Research* 2016; 137: 169–173
- Geleijnse JM, Launer LJ, Kuip DAVID, Hofman A, Witteman JCM. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2002; 75:880–6
- Gryglewski RJ, Korburt R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antitrombotic action of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 1987; 36: 317-322
- Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garci O, Vicente V, Rivera J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004; 3: 369–376
- Guerrero JA, Navarro-Nunez L, Lozano ML, Martínez C, Vicente V, Gibbins JM, Rivera J. Flavonoids inhibit the platelet TxA₂ signalling pathway and antagonize TxA₂ receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2007; 64(2): 133–144
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure - activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13: 572–584
- Hubbard GP, Stevens JM, Cicmil M, Sage T, Jordan PA, Williams CM, et al. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2003;1(5):1079-88.
- Chiou YL, Lin SR, Hu WP, Chang LS. Quercetin modulates activities of Taiwan cobra phospholipase A₂ via its effects on membrane structure and membrane-bound mode of phospholipase A₂. *Journal of Biosciences* 2012; 37(2): 277–287
- Choi JH, Park SE, Kim SJ, Kim S. Kaempferol inhibits thrombosis and platelet activation. *Biochimie* 2015; 115: 177-186
- Iglesias CV, Aparicio R, Rodrigues – Simioni L, Camargo EA, Antunes E, Marangoni S, Toyama DDO, Beriam LOS, Monteiro HSA, Toyama MH. Effects of morin on snake venom phospholipase A₂ (PLA₂). *Toxicon* 2005; 46: 751–758
- Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007; 109: 5087-5095

- Janssen K, Mensink RP, Cox FJJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PCH, Katan MB. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998; 67:255–62
- Jin YR, Hanb XH, Zhang YH, Lee JJ, Limb Y, Chungd JH, Yun PY. Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC- γ 2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis* 2007; 194: 144–152
- Jun NJ, Kim SCH, Song EY, Jang KCH, Lee DS, Cho SK. Isolation of Anticancer Compounds from *Peucedanum japonicum* Thunb. Roots. *Korean Journal of Plant Research* 2014; 27(3):215-222
- Karlíčková J, Říha M, Filipický T, Macáková K, Hrdina R, Mladěnka P. Antiplatelet Effects of Flavonoids Mediated by Inhibition of Arachidonic Acid Based Pathway. *Planta Med* 2016; 82: 76-83
- Kelly C, Hunter K, Crosbie L, Gordon MJ, Dutta -Roy AK. Modulation of human platelet function by food flavonoids. *Biochemical Society Transaction* 1996; 24
- Kim JM, Yun-Choi HS. Anti-platelet Effects of Flavonoids and Flavonoid-glycosides from *Sophora japonica*. *Archives of Pharmacal Research* 2008; 31: 886- 890
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, AromaA. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:560–8
- Kolář J. Alfimepráza – nové fibrinolytikum. *Klinická farmakologie a farmacie* 2008; 22(1): 18–22
- Ku SK, Lee HG, Bae JS. Inhibitory effect of baicalin, baicalein and wogonin on secretory group IIA phospholipase A₂. *Archives of Pharmacal Research* 2015; 38:1865–1872
- Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JRS, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo- oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron- reducing ability. *Biochemical Pharmacology* 1991; 42: 1673-1681
- Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research* 2008; 28: 729–737
- Lincová D, Farghali H et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén,2007. 672s. ISBN:978-80-7262-373-0

- Lindahl M, Tagesson CH. Flavanoids as phospholipase A2 inhibitors: Importance of Their Structure for Selective Inhibition of Group II A2. *Inflammation* 1997; 21: 347-356
- Lua WJ, Lina KCH, Liu CHP, Lin CHY, Wu HCH, Chou DS, Geraldine P, Huang SY, Hsieh CHY, Sheu JR. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2016; 28: 1–8
- Manach C, Scalbert A, Morand CH, Rémésy CH, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition* 2004; 79:727-747
- McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2012; 95:454–64
- McNicol A, Israels SJ. Platelets and Anti-platelet Therapy. *Journal of Pharmacological Sciences* 2003; 93: 381 – 396
- Mladěnka P, Zatloukalová L, Filipský T, Hrdina R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* 2010; 49: 963–975
- Monorey MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JRS. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1998; 40: 787-792
- Morel A, Miller E, Bijak M, Saluk J. The increased level of COX-dependent arachidonic acid metabolism in blood platelets from secondary progressive multiple sclerosis patients. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2016; 420: 85–94
- Mosawy S, Jackson DE, Woodman OL, Linden MD. Inhibition of platelet-mediated arterial thrombosis and platelet granule exocytosis by 3',4'-dihydroxyflavonol and quercetin. *Platelets* 2013;24(8):594-604.
- Mower RL, Landolfi R, Steiner M. Inhibition *in vitro* of platelet aggregation and arachidonic acid metabolism by flavone. *Biochemical Pharmacology* 1984; 33: 357-363
- Nagy M, Grančai D, Mučaji P. *Farmakognózia. Biogénéza prírodných látok*. Martin: Osveta, 2011.237s. ISBN 978-80-8063-368-4

- Navarro-Nunez L, Rivera J, Guerrero JA, Martínez C, Vicente V, Lozano ML. Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR1 and PAR4 in platelets. *British Journal of Pharmacology* 2009; 158: 1548–1556
- Navarro-Nunez L, Castillo J, Lozano ML, Martinez C, Benavente-Garcia O, Vicente V, Rivera J. Thromboxane A2 receptor antagonism by flavonoids: structure-activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57: 1589–1594
- Navarro-Nunez L, Lozano MR, Palomo M, Martinez C, Vicente V, Castillo J, Benavente-Garcia O, Diaz-Ricart M, Rivera J. Apigenin Inhibits Platelet Adhesion and Thrombus Formation and Synergizes with Aspirin in the Suppression of the Arachidonic Acid Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 2970–2976
- Navarro-Nunez L, Rivera J, Guerrero JA, Martínez C, Vicente V, Lozano ML. Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR1 and PAR4 in platelets. *British Journal of Pharmacology*. 2009; 158: 1548–1556
- Nile SH, KeumYS, Saini RK, Patel RV. Characterization of total phenolics, antioxidant and antiplatelet activity of unpolished and polished rice varieties. *Food Measure* 2017; 11:236–244
- Nunes C, Almeida L, Barbosa RM, Laranjinha J. Luteolin suppresses the JAK/STAT pathway in a cellular model of intestinal inflammation. *Food Function* 2017; 8: 387–396
- Oh WJ, Endale M, Park SC, Cho JY, Rhee MH. Dual Roles of Quercetin in Platelets: Phosphoinositide-3-Kinase and MAP Kinases Inhibition, and cAMP-Dependent Vasodilator- Stimulated Phosphoprotein Stimulation. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2012; 2012: 485262.
- Pavlovičová R. Základné aspekty sekundárneho metabolizmu a jeho prejavy v metabolizme húb. *Chemické Listy* 1998; 92: 406-414
- Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72: 1150–5

- Pignatelli P, Pulcinelli FM, Lenti L, Gazzaniga PP, Violi F. Hydrogen Peroxide Is Involved in Collagen-Induced Platelet Activation. *The American Society of Hematology* 1998; 91: 484-490
- Pillai L, Levy RM, Yimam M, Zhao Y, Jia Q, Burnett BP. Flavocoxid, an Anti-inflammatory Agent of Botanical Origin, Does Not Affect Coagulation or Interact with Anticoagulation Therapies. *Advances in Therapy* 2010; 27(6): 400-411
- Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology* 2006; 72: 1439 – 1452
- Reis JF, Monteiro VVSM, Gomes RdS, Carmo MMd, Costa GVd, Ribera PC, Monteiro MCH. Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. *Journal of Translational Medicine* 2016; 14: 315
- Ribeiro D, Freitas M, Tomé SM, Silva AMS, Laufer S, Lima JLFC, Fernandes E. Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Cytokine/ Chemokine Production in Human Whole Blood. *Inflammation* 2015; 38: 858-70
- Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2011; 31(5): 986–1000
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Pagana G. Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology & Medicine* 1996; 20: 933-956
- Santos ML, Toyama DO, Oliveira SCB, Cotrim CA, Diz-Filho EBS, Fagundes FHR, Soares VCG, Aparicio R, Toyama MH. Modulation of the Pharmacological Activities of Secretory Phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* Induced by Naringin. *Molecules* 2011; 16: 738-761
- Slíva J, Votava M. *Farmakologie*. Praha: Tritov, 2010. 240s. ISBN:978-80-7387-424-7
- Smyth SS, Woulfe DS, Weitz JI, Gachet CH, Conley PB, Goodman SG, Roe MT, Kuliopulos A, Moliterno DJ, French PA, Steinhubl SR, Becker RC. G-Protein–Coupled Receptors as Signaling Targets for Antiplatelet Therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2009; 29:449-457
- Suen J, Thomas J, Kranz A, Vun S, Miller M. Effect of Flavonoids on Oxidative Stress and Inflammation in Adults at Risk of Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *Healthcare* 2016; 4: 69

Tomko J, Kresánek J, Hubík J, Suchý V, Felklová M, Sikyta B, Libický A. Farmakognózia: učebnica pre farmaceutické fakulty. Martin: Osveta,1999. 422 s. ISBN: 8080630143

Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food Chemistry 2007; 104 : 466–479

Verpoorte R, Memelink J. Engineering secondary metabolite production in plants. Current Opinion in Biotechnology 2002; 13:181–187

Winkel-Shirley B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. Plant Physiology 2001; 126: 485-493

Wright B, Moraes LA, Kemp CHF, Mullen W, Crozier A, Lovegrove1 JA, Gibbins JM. A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. British Journal of Pharmacology 2010; 159: 1312–1325

Wu CHM, Wu SCH, Chung WJ, Lin HCH, Chen KT, Chen YCH, Hsu MF, Yang JM, Wang JP, Lin CHN. Antiplatelet Effect and Selective Binding to Cyclooxygenase (COX) by Molecular Docking Analysis of Flavonoids and Lignans. International Journal of Molecular Sciences 2007; 8: 830-841

Xiang Y, Wei X, Chen L, Liu H, Liu X, Wang T, Zhang X. Anti-inflammatory Effect of Acetylpuerarin on Eicosanoid Signaling Pathway in Primary Rat Astrocytes. Journal of Molecular Neuroscience 2014; 52: 577–585

You KM, Jong HG, Kim HP. Inhibition of Cyclooxygenase/Lipoxygenase from Human Platelets by Polyhydroxylated/Methoxylated Flavonoids Isolated from Medicinal Plants. Archives of Pharmacal Research 1999; 22: 18-24