

## **Abstrakt**

**Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra:** Katedra farmakologie a toxikologie

**Kandidát:** Mgr. Marcel Hrubša

**Školitel:** Prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

**Názov dizertačnej práce:** Vliv metabolitů a jejich parentních fenolických látek na krevní destičky

Akútne kardiovaskulárne príhody, ako napríklad mozgová mŕtvica alebo akútne koronárne syndrómy, ku ktorým patrí akútny infarkt myokardu, sú jedny z najčastejších príčin kardiovaskulárnych úmrtí vo svete. V súčasnosti sa ich liečba zameriava najmä na sekundárnu prevenciu opätovného výskytu týchto stavov, v ktorej významnú úlohu zohrávajú protidoštičkové liečivá. Tieto liečivá znižujú nadmernú reaktivitu doštičiek, ktorá je prítomná u prevažnej väčšiny kardiovaskulárnych a metabolických ochorení a významne znižujú riziko akútnych kardiovaskulárnych príhod. Paleta momentálne dostupných liečiv sa ale vyznačuje mnohými problémami, ako je napríklad rezistencia, vysoká variabilita vo farmakokinetike aj farmakodynamike, vážne nežiaduce účinky a cesta podania liečiva.

V úvode tejto práce sú stručne zhrnuté znalosti o fyziológii ľudských krvných doštičiek a dostupných antiagregačných liečivách vrátane ich mechanizmov účinku. Druhá časť teoretického úvodu je venovaná polyfenolickým látkam, nakoľko strava bohatá na polyfenoly je spájaná so zdravím prospešnými účinkami, najmä u metabolických a kardiovaskulárnych ochorení. Polyfenolické látky sa avšak vyznačujú vo všeobecnosti nízkou biodostupnosťou. Z toho dôvodu vznikla hypotéza, že malé fenolické látky tvorené ľudskou črevnou mikroflórou sú zodpovedné za tieto prospešné účinky, nakoľko dosahujú výrazne vyšších plazmatických hladín než parentné polyfenoly. V tejto práci bol vyhodnotený antiagregačný efekt rozličných metabolitov polyfenolických látok a takisto bol skúmaný ich mechanizmus účinku.

Ako príklad metabolitov druhej fázy biotransformácie polyfenolov bolo otestovaných šesť sulfátov silymarínových flavonolignanov spolu s ich parentnými látkami. Ich antiagregačná aktivita bola ale bohužiaľ zanedbateľná.

S ohľadom na tieto výsledky sme sa namiesto toho zamerali na malé fenolické metabolity polyfenolov. Štyri metabolity typické pre izoflavonoidy a 29 známych malých metabolitov flavonoidov bolo skúmaných v rámci ich aktivity aj mechanizmu účinku. Zistili sme, že 3 zo 4 izoflavonoidných metabolitov môže mať relevantné účinky na agregáciu doštičiek. 4-etylfenol dokázal čiastočne

inhibovať cyklooxygenázu aj tromboxán syntázu a súčasne narušovať vápnikovú signalizáciu, ekvivalent bol naopak antagonistom na tromboxánových receptoroch. O-desmetylangolensín sa mechanizmom účinku podobal 4-etylfenolu, bol ale jednoznačne menej účinnou látkou.

V štúdií s 29 metabolitmi flavonoidov boli identifikované 4 látky, ktoré môžu prispievať k antiagregačnému účinku stravy bohatej na polyfenoly. Každá z týchto látok (rezorcinol, pyrogalol, floroglucinol a 4-metylkatechol (4-MC)) patrila štruktúrne do skupiny hydroxybenzénov a bola účinnou antiagregačnou látkou. Nasledujúce experimenty ukázali, že pyrogalol a 4-MC sú najúčinnjšími metabolitmi. Pyrogalol sa účinnosťou podobal acetylsalicylovej kyseline (ASA), avšak 4-MC bol 10-krát účinnejší ako ASA. Účinok oboch látok bol súčasne potvrdený s využitím nového *ex ovo „in vivo-like“* modelu HET-CAV; 4-MC bol opäť účinnejší ako ASA. Prvotné pokusy vykonané v tejto štúdií naznačili, že 4-MC narušuje vápnikovú signalizáciu v doštičkách. Nasledovné štúdie, ktoré sme vykonali, nám umožnili jeho mechanizmus účinku preskúmať podrobnejšie. 4-MC blokuje viacero agregáčnych dráh, ale jeho hlavný mechanizmus je cieleň na dráhy spojené s kolagénom a kyselinou arachidónovou (AA). Na rozdiel od predchádzajúcich metabolitov, 4-MC nemal účinok na cyklooxygenázu ani tromboxán syntázu, dokonca nebol ani antagonistom tromboxánových receptorov. Zistili sme, že interferuje s premenou arachidónovej kyseliny na tromboxán  $A_2$ , pravdepodobne narušením koordinácie medzi cyklooxygenázou a tromboxán syntázou nutnej k tvorbe tromboxánu  $A_2$ .

Tieto poznatky spolu so zistením, že 4-MC je účinnejší ako ASA z neho robia nádejného kandidáta pre vývoj antiagregačných liečiv. Účinok 4-MC sme teda chceli overiť, a to s využitím rozmanitej populačnej vzorky zloženej zo zdravých darcov vo veku 20-66 rokov. S použitím relatívne veľkého množstva darcov sa nám podarilo potvrdiť účinok a vysokú účinnosť 4-MC, ktorý bol účinnejší ako ASA u agregácie vyvolanej arachidónovou kyselinou aj kolagénom. Efekt 10  $\mu\text{M}$  4-MC sa pohyboval medzi účinkom 30  $\mu\text{M}$  a 70  $\mu\text{M}$  ASA u agregácie vyvolanej AA. U agregácie navodenej kolagénom bola 70  $\mu\text{M}$  dávka ASA o ~17% účinnejšia ako 20  $\mu\text{M}$  4-MC, ale o ~12% menej účinná ako rovnaká koncentrácia 4-MC.

Aj napriek tomu že 4-MC je veľmi účinný, sme chceli preskúmať vzťah medzi štruktúrou a účinkom tejto malej a relatívne štruktúrne jednoduchej látky. Vybrali sme teda 22 látok štruktúrne odvodených od 4-MC a vyhodnotili ich antiagregačné účinky spolu s *in vitro* testovaním toxicity. Táto štúdia nám poskytla nielen zaujímavé poznatky o tom, ktoré štruktúrne prvky musia byť zachované, aby sa zachovala antiagregačná aktivita, ale aj vplyv substitúcie základnej štruktúry na jej aktivitu.

V tejto práci som ukázal, že 4-MC, malá fenolická látka vznikajúca mikrobiálnym metabolizmom polyfenolov, je účinnou antiagregačnou látkou a spolu so svojimi derivátmi môže predstavovať novú stratégiu vo vývoji protidoštičkových liečiv.