

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie



Vliv metabolitů a jejich parentních fenolických látek na krevní
destičky

Dizertačná práce

Mgr. Marcel Hrubša

„Prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracoval samostatne, pod vedením svojho školiteľa. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného, alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa 28. 11. 2022

Mgr. Marcel Hrubša

Pod'akovanie

Chcel by som predovšetkým poďakovať školiteľovi prof. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D. za možnosť venovať sa postgraduálnemu štúdiu pod jeho vedením a jeho trpezlivosť a podporu. Takisto ďakujem členom skupiny Kardiovaskulárni a respirační farmakologie a toxikologie za priateľské pracovné prostredie a pomoc počas PhD štúdia.

Ďakujem taktiež prof. Marianne Nissen Lund, Ph.D. za odborné vedenie počas mojej stáže na Univerzite v Kodani.

Veľké poďakovanie patrí všetkým, ktorí ma počas môjho štúdia tolerovali a podporovali. Taktiež ďakujem Marii za jej neustálu pozitivitu, súdnosť a životné rady.

Za finančnú podporu ďakujem Univerzite Karlově (grant GAUK 1322120-C3 a projektu Grantová schémata na UK, reg.č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/19_073/0016935), agentuře pro zdravotnický výzkum (projekty NU21-02-00135 a NU21J-02-00021), fondu Specifického vysokokoškolského výzkumu (SVV 260 549) a programu ERASMUS+ (2020-1-CZ01-KA203-078218).

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 mikrofórou 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 flavonolignánov 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 narúšať vápnikovou signalizáciu, ekvol 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 cielený 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 μM 4-MC sa pohyboval medzi účinkom 30 μM a 70 μM ASA u agregácie vyvolanej AA. U agregácie navodenej kolagénom bola 70 μM dávka ASA o ~17% účinnejšia ako 20 μM 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.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Marcel Hrubša

Supervisor: Prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Title of dissertation thesis: The influence of metabolites and their parent phenolic compounds on blood platelets

Acute cardiovascular events (ACEs), such as stroke and acute coronary syndromes encompassing acute myocardial infarction, are one of the main causes of cardiovascular mortality in the world. Current pharmacotherapy focuses primarily on secondary prevention of their recurrence, where antiplatelet drugs play a key role. These drugs reduce platelet hyperreactivity, which is present in the majority of cardiovascular and metabolic diseases, and significantly decrease the risk of ACEs. However, the palette of currently available drugs faces many issues, such as resistance, high variability in both pharmacokinetics and pharmacodynamics, serious side effects and the route of administration.

This thesis firstly briefly summarizes the current knowledge of platelet physiology along with available antiplatelet drugs and their mechanism of action. Second part of the theoretical introduction is dedicated to polyphenolic compounds, as polyphenol-rich diet is associated with many beneficial effects, particularly on metabolic and cardiovascular diseases. However, polyphenolic compounds have, in general, low bioavailability. Therefore, small phenolic compounds formed by human intestinal microbiome have been suggested to be the cause of these benefits, as they achieve much higher plasma concentrations than the parent polyphenols. In this thesis, the antiplatelet effect of various metabolites of polyphenols has been evaluated and their mechanism of action was also investigated.

Six silymarin flavanolignan sulfates were tested as representatives of secondary phase metabolites of parent polyphenols along with their parent compounds. Their antiplatelet activity was, however, negligible.

For this reason, we have instead turned our attention to small phenolic metabolites of polyphenols. Four isoflavonoid-specific small metabolites and 29 known flavonoid small metabolites were examined in terms of their antiplatelet activity and mechanism of action. We have found that 3 out of 4 tested isoflavonoid metabolites can have relevant effects on platelet aggregation. 4-ethylphenol seemed to partially inhibit both cyclooxygenase and thromboxane synthase and interfered with calcium signalling, while equol was a thromboxane receptor antagonist.

O-desmethylangolensin was similar to 4-ethylphenol in terms of mechanism, but clearly inferior in terms of potency.

The study with 29 flavonoid metabolites has identified 4 compounds, which can contribute to antiplatelet effects of flavonoid-rich diet. All 4 of these compounds belonged to the group of hydroxybenzenes and were potent antiplatelet compounds: resorcinol, pyrogallol, phloroglucinol, and 4-methylcatechol (4-MC). Further experiments have shown that pyrogallol and 4-MC were by far the most potent of them. Pyrogallol was similar to acetylsalicylic acid (ASA) in terms of potency, while 4-MC was 10 times more potent than ASA. Their effect was also confirmed using a novel HET-CAV (hen's egg test on chick area vasculosa) *ex ovo in vivo-like* model; 4-MC was once again more potent than ASA. Initial mechanistic studies performed in this study have suggested, that 4-MC interferes with calcium signalling in platelets. Following studies performed by us have shed more light on its mechanism of action. 4-MC was able to block many aggregatory pathways, but the major mechanism was targeted to collagen and arachidonic acid derived pathways. In contrast to the previous compounds, 4-MC did neither block cyclooxygenase 1 and thromboxane synthase, nor acted as an antagonist at thromboxane receptors. Finally, it was found that it interferes with transformation of arachidonic acid to thromboxane A₂ likely by blockade of cyclooxygenase and thromboxane synthase coupling.

This, associated with the fact that 4-MC was more potent than ASA makes 4-MC an interesting candidate for antiplatelet drug development. The efficacy of 4-MC was therefore investigated using a heterogenous population sample of 53 healthy donors aged 20-66 years old. Using this relatively robust sample, we were able to confirm the potency and efficacy of 4-MC, which was confirmed to be more potent than ASA in both arachidonic acid and collagen induced aggregation. The effect of 10 µM of 4-MC lay between the effect of 30 µM and 70 µM of ASA on AA-triggered platelet aggregation. In terms of collagen triggered aggregation, 70 µM of ASA was ~17% more potent than 20 µM of 4-MC but ~12% less potent than the equimolar concentration of 4-MC. 4-MC is therefore a potent antiplatelet compound.

While the potency of 4-MC was clearly high, we have also wanted to explore the structure-activity relationship of this fairly small and structurally simple molecule. Hence, 22 structurally related compounds were investigated using human whole blood in terms of antiplatelet activity and *in vitro* toxicity. This study has provided interesting insights in terms of structural elements necessary to retain the antiplatelet activity, while also exploring the effect of substitution of the base structure.

This thesis has shown, that 4-MC, a small phenolic compound derived from microbial metabolism of polyphenols is an efficient antiplatelet compound and may present, along with its derivatives, a novel avenue in antiplatelet therapy.

OBSAH

1.	Úvod	12
2.	Doštičky a patofyziológia kardiovaskulárnych ochorení	13
2.1.	Ateroskleróza	13
2.2.	Diabetes mellitus a funkcia doštičiek	14
2.3.	Hypertenzia	15
3.	Ľudské doštičky	16
3.1.	Vývoj ľudských doštičiek	16
3.2.	Počet doštičiek	17
3.3.	Štruktúra.....	17
4.	Mediátori agregácie doštičiek a ich kaskády.....	19
4.1.	Tromboxán	19
4.2.	Kolagén.....	20
4.3.	Trombín	22
4.4.	Faktor aktivujúci doštičky (PAF, z angl. platelet activating factor)	23
4.5.	Adenzín difosfát (ADP)	23
4.6.	Glykoproteín $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ (známy tiež ako GPIIb-IIIa)	24
5.	Agregačná kaskáda	25
6.	Antiagregačná terapia	27
7.	Flavonoidy	29
7.1.	Flavonoidné metabolity	31
8.	Cieľ práce.....	33
9.	Recenzované odborné publikácie vzťahujúce sa k téme dizertačnej práce.....	34
9.1.	4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects	34
9.2.	The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper.....	35
9.3.	The Effect of Silymarin Flavonolignans and Their Sulfated Conjugates on Platelet Aggregation and Blood Vessels Ex Vivo	36
9.4.	Synthesis of 3,3-dimethyl-6-oxopyrano[3,4-c]pyridines and their antiplatelet and vasodilatory activity	37
9.5.	Comparison of Antiplatelet Effects of Phenol Derivatives in Humans.....	38
9.6.	The Antiplatelet Effect of 4-Methylcatechol in a Real Population Sample and Determination of the Mechanism of Action	39
10.	Komentár k vybraným publikáciám.....	40
11.	Podiel kandidáta na publikáciách.....	47
12.	Prehľad publikovaných prác	48
13.	Prezentovanie výsledkov na konferenciách	50
14.	Zoznam použitej literatúry	51

Zoznam použitých skratiek

- AA – arachidonic acid, kyselina arachidónová
ADP – adenosine diphosphate, adenzín difosfát
ASA – acetylsalicylic acid, kyselina acetylsalicylová
COX-1 – cyklooxygenáza 1
DM 2 – diabetes mellitus typu 2
DTT - dithiotreitol
DTS – dense tubular system, denzný tubulárny systém
HDL - high density lipoprotein, lipoproteín s vysokou hustotou
IP₃ – inositol trifosfát
LDL – low density lipoprotein, lipoproteín s nízkou hustotou
MAPK – mitogénom aktivovaná proteín kináza
MK – megakaryocyt
NMK – nenasýtené mastné kyseliny
OCS – open canalicular system, otvorený kanalikulárny systém
O-DMA – O-desmethylangolensin
PAF – platelet activating factor, faktor aktivujúci doštičky
PC - fosfatidylcholín
PDE – fosfodiesteráza
PE - fosfatidyletanolamín
PKC – protein kináza C
PLA₂ – fosfolipáza A₂
PLC – fosfolipáza C
PS - fosfatidylserín
ROS – reactive oxygen species, reaktívne formy kyslíka
SM - sfingomyelín
TXA₂ – tromboxán A₂
vWF – von Willebrandov faktor

Zoznam tabuliek

Tab 1 : Popis granúlí trombocytov

Tab 2 : Receptory zúčastňujúce sa na agregáčnom procese

Tab 3 : Klinicky používané antiagregačné liečivá

Tab 4 : Príjem polyfenolov v potrave u dospeljej populácie

Tab 5 : Obsah polyfenolických látok vo vybraných potravinách

Tab 6 : Účinky 4-metylkatecholu v biologických systémoch

Zoznam obrázkov

Obr.1: Vývojové štádiá megakaryocytu

Obr.2 : Hlavné kolagénové receptory a kaskády, ktoré aktivujú

Obr.3 : Štruktúra PAF

Obr.4 : Transdukcia signálu prostredníctvom ADP receptorov

Obr.5 : Hemokoagulačná kaskáda

Obr.6 : Všeobecná štruktúra flavonoidov

1. Úvod

Prevalencia kardiovaskulárnych ochorení vo svete neustále narastá a akútne kardiovaskulárne príhody ako akútny infarkt myokardu alebo mozgová mŕtvica patria medzi najčastejšie príčiny kardiovaskulárnej mortality. Súčasná farmakoterapia je zameraná na sekundárnu prevenciu akútnych kardiovaskulárnych príhod prostredníctvom znižovania hyperreaktivity krvných doštičiek, aktuálne dostupné liečivá majú ale viacero nedostatkov, ktoré komplikujú úspešnú prevenciu. Vývoj nových protidoštičkových liečiv s inými mechanizmami účinku je teda veľmi žiaduci.

Strava bohatá na polyfenolické látky je spájaná s pozitívnymi účinkami na ľudské zdravie, najmä v súvislosti s civilizačnými a kardiovaskulárnymi ochoreniami. Presný mechanizmus, ktorým polyfenolické látky obsiahnuté v strave pôsobia ale ešte nebol objasnený. Vzhľadom na nízku biodostupnosť väčšiny polyfenolov je nepravdepodobné, že látky obsiahnuté v potrave bohatej na polyfenoly sú priamo zodpovedné za ich biologické účinky *in vivo*.

Jedným z vysvetlení tohto fenoménu môže byť intenzívny metabolizmus parentných polyfenolických látok sprostredkovaný črevným mikrobiómom. Tieto metabolity charakteru malých fenolických látok majú preukázateľne vyššiu biodostupnosť ako parentné polyfenoly, dosahujú teda relevantné plazmatické koncentrácie *in vivo*.

Preto som sa v tejto dizertačnej práci zameril na metabolity polyfenolov a ich antiagregačné účinky. U najúčinnejšieho metabolitu, 4-metylkatecholu, bol jeho účinok potvrdený na heterogénnej populačnej skupine a zároveň bol preskúmaný jeho mechanizmus účinku a vzťah štruktúry a účinku jeho derivátov.

2. Doštičky a patofyziológia kardiovaskulárnych ochorení

2.1. Ateroskleróza

Ateroskleróza je chronické, multifaktoriálne ochorenie, ktoré je jednou z hlavných príčin kardiovaskulárnych ochorení v modernej populácii. Aterosklerotické ochorenia, najmä ich akútne komplikácie vo forme akútneho infarktu myokardu alebo mozgovej porážky patria v súčasnosti medzi najčastejšie príčiny úmrtia vo svete. Patofyziológia aterosklerózy ešte stále nie je jednoznačne objasnená, primárne mechanizmy jej vzniku sú však známe. Podstatou vzniku aterosklerotických ložísk je ukladanie krvných lipidov do vnútorných vrstiev cievnej steny, kde vyvolajú sterilný zápal a remodeláciu poškodenej cievy. Nenarušená cievna stena je nepriepustná pre krvné lipoproteíny, pri jej narušení ale dochádza k prepúšťaniu lipoproteínov s nízkou hustotou (LDL- low density lipoprotein) a prieniku imunitných buniek [1-3]. Fyziologickou úlohou LDL je transport cholesterolu v krvi smerom do tkanív, pričom dospelému človeku postačuje koncentrácia 0,5- 1 mM krvi. Vzhľadom na životný štýl modernej populácie koncentrácia LDL v plazme výrazne presahuje tieto hladiny a cievna stena je preto neustále vystavovaná nadmernému množstvu cholesterolu, ktorý je hlavným rizikovým faktorom pre rozvoj aterosklerózy [4]. Lipoproteín s vysokou hustotou (HDL – high density lipoprotein) je naopak spájaný s transportom prebytočného cholesterolu do pečene, a tak nižším rizikom rozvoja aterosklerózy. Viacero štúdií cielených na zvyšovanie koncentrácií HDL ale nevedlo k zlepšeniu prognózy aterosklerózy. Preto sa súčasný výskum zameriava na úpravu funkcie HDL častíc namiesto priameho zvyšovania HDL koncentrácií [5].

LDL ktorý sa akumuluje v tunica intima cievnej steny je vychytávaný najmä makrofágmi, ale aj bunkami hladkej svaloviny, ktoré sú následne transformované na penové bunky. Akumulované penové bunky produkujú cytokíny a rastové faktory a nakoniec podliehajú nekróze, čím dochádza k tvorbe aterosklerotického ložiska. Toto ložisko je typicky tvorené nekrotickým jadrom obsahujúcim odumreté makrofágy a penové bunky, postupne ale dochádza k remodelácii poškodenej cievy a produkované cytokíny do ložiska privádzajú ďalšie imunitné bunky, vrátane B a T lymfocytov. V dôsledku remodelácie dochádza k tvorbe fibróznej čiapky tvorenej kolagénom a hladkou cievnu svalovinou. Táto remodelácia vedie k dvom hlavným komplikáciám, ktoré sú príčinou mortality. Postupne dochádza k zužovaniu priemeru cievy, čo najmä v prípade, že je postihnutá menšia cieva, spôsobuje ischemiu kvôli zníženému prietoku krvi. Ďalšou komplikáciou je malá stabilita tohto ložiska spôsobená prítomnosťou chronickému zápalového procesu. Pri narušení aterosklerotického plaku dôjde ku kontaktu subendotelových štruktúr a krvi, čo vedie ku spusteniu hemokoagulačnej kaskády a tvorbe trombu. Tento trombus môže následne úplne zastaviť prietok krvi v cieve, čo môže viesť v extrémnych prípadoch k akútnemu infarktu myokardu alebo mozgovej mŕtvici [1-3].

Antiagregačná terapia je jedným z hlavných nástrojov sekundárnej prevencie aterotrombotických príhod. Súčasný výskum ale ukazuje, že doštičky sa podieľajú aj na tvorbe a rozvoji aterosklerotického plaku, a teda sú potenciálnym nástrojom primárnej prevencie a spomaľovania progresu aterosklerózy [6].

2.2. Diabetes mellitus a funkcia doštičiek

Diabetes mellitus typu 2 (DM 2) je komplexné metabolické ochorenie ktorého výskyt v civilizovanom svete rapídne narastá [7]. Pacienti s DM 2 trpia vyšším rizikom aterosklerotických komplikácií, vyššou mierou kardiovaskulárneho rizika a rýchlejšim rozvojom aterosklerózy v porovnaní so zdravou populáciou [8]. Približne 4/5 mortality diabetikov je spojených s trombózou a diabetici majú 2 až 4 - násobne vyššie riziko opakovaných vaskulárnych a aterotrombotických komplikácií [9, 10].

Miera kardiovaskulárneho rizika DM 2 pacientov bez predchádzajúcich kardiovaskulárnych komplikácií dosahuje dokonca úroveň pacientov po akútnom infarkte myokardu [11]. V prípade prítomnosti kardiovaskulárneho ochorenia sa diabetici vyznačujú horšou prognózou a vyšším rizikom komplikácií a opakovaných aterotrombotických stavov [12].

Viacero štúdií pozorovalo výskyt protrombotického stavu u DM 2 pacientov, na ktorom sa podieľa zvýšená hemokoagulácia, narušená fibrinolýza, dysfunkčný endotel a takisto zvýšená reaktivita krvných doštičiek. Trombocyty diabetikov sú charakteristické narušením niekoľkých signálnych dráh, čo vyúsťuje v ich nadmernú adhéziu, aktiváciu a agregáciu a tým vedie k zníženej efektívite antiagregačných liečiv [12-14].

Doštičky diabetikov majú zvýšenú expresiu aktivačných markerov v porovnaní so zdravou populáciou, úprava glykémie u týchto pacientov viedla k signifikantnému zníženiu týchto markerov [15]. Yngen et al. spozoroval, že hladiny glykovaného hemoglobínu HbA1C a glykémia nalačno korelovali s expresiou P-selektínu (markeru aktivácie doštičiek, viz. nižšie) [16]. Tieto výsledky naznačujú, že úpravou glykémie je možné tieto patologické zmeny aspoň čiastočne zvrátiť a kardiovaskulárne riziko znížiť. Vyššie spomínané laboratórne výsledky boli doplnené aj o klinické dáta, ktoré potvrdzujú túto hypotézu, a to v štúdiu DIGAMI. V štúdiu DIGAMI bolo spozorované signifikantné zníženie mortality pri použití intenzívnej glukózu znižujúcej intervencie po dobu 3,4 roku [17]. Štúdia DIGAMI-2 porovnávala 3 rozdielne stratégie znižovania glykémie, neboli však spozorované žiadne rozdiely medzi zvolenými stratégiami [18]. Nadmerné znižovanie glykémie ale naopak viedlo k zvýšeniu mortality, čo vyplýva z výsledkov štúdií ACCORD a NICE-SUGAR [19, 20].

Nedostatok inzulínu a inzulínová rezistencia sú ďalšie typické charakteristiky DM 2. Vzhľadom na to, že doštičky exprimujú receptory pre inzulín preto nie je prekvapivé, že spolu s inzulínovou rezistenciou bola pozorovaná aj zvýšená koncentrácia intracelulárneho vápnika doštičiek, znížená citlivosť voči prostacyklínu a oxidu dusnému a zvýšená reaktivita doštičiek [12]. Pilotné štúdie

pozorovali benefit pri použití inzulínových senzitizerov, na ktoré nadväzovali viaceré klinické štúdie [21, 22]. Štúdia PERISCOPE pozorovala miernejší rozvoj aterosklerózy pri použití pioglitazónu (senzitizer) v porovnaní s glimepiridom (sekretagógum) v časovom horizonte 18 mesiacov [23]. Podobný efekt bol sekundárne pozorovaný u štúdií SYMPHONY a SYMPHONY-2 [24]. Tieto výsledky ale bohužiaľ neboli potvrdené štúdiou APPROACH, v ktorej rosiglitazón nepreukázal miernejšiu progresiu koronárnej aterosklerózy v porovnaní s glipizidom [25]. Tento výsledok nie je prekvapivý, nakoľko rosiglitazón bol z dôvodu zhoršovania kardiovaskulárnych ochorení stiahnutý z európskeho trhu. Prospešný efekt pioglitazónu bol potvrdený viacerými štúdiami, preto je odporúčaný u diabetikov so zvýšeným kardiovaskulárnym rizikom. Je ale takisto treba spomenúť, že obe tieto liečivá preukázateľne zhoršujú srdcové zlyhanie [26, 27].

Diabetes mellitus typu 2 takisto typicky sprevádzajú aj ďalšie metabolické stavy : obezita, dyslipidémia, chronický zápalový stav a zvýšený oxidačný stres. Obézni pacienti sa vyznačujú zvýšeným počtom doštičiek, zvýšeným stredným objemom doštičiek [28], zvýšenou hladinou leptínu, ktorá je spájaná s vyššou agregabilitou doštičiek [29], vyššou cytozolovou hladinou vápnika [30] a zvýšeným oxidačným stresom [31]. Všetky tieto faktory vedú k vyššej reaktivite doštičiek [12, 13].

U diabetických pacientov bol takisto zistený zvýšený obrat doštičiek a vyšší podiel retikulovaných doštičiek, ktoré sú typické zvýšenou citlivosťou [32]. Navyše bola u týchto pacientov spozorovaná horšia odpoveď na antiagregačnú terapiu a súčasné odporúčania navrhujú zohľadňovať prítomnosť DM 2 pri voľbe farmakoterapie [12].

2.3. Hypertenzia

Hypertenzia je bežné kardiovaskulárne ochorenie, ktoré postihuje približne 30 % dospelé populácie a jej prevalencia neustále narastá [33]. Je jedným z rizikových faktorov aterosklerotických komplikácií, nakoľko ovplyvňuje funkciu cievnej steny aj krvných doštičiek [34].

Trombocyty hypertenzívnych pacientov majú špecifické biochemické aj morfológické parametre, ktoré prispievajú k rozvoju aterosklerózy. Morfológicky sa tieto doštičky vyznačujú vyšším stredným objemom, vyššou strednou hmotou, nižšou granularitou a vyššou celkovou veľkosťou v porovnaní s normotenzívnymi jedincami. Zvýšený stredný objem doštičiek je považovaný za rizikový faktor akútneho infarktu myokardu a marker aktivácie doštičiek. Biochemicky majú zvýšené hladiny Ca^{2+} , pri aktivácii produkujú vyššie množstvo reaktívnych foriem kyslíka (ROS), vylučujú viac P-selektínu a takisto majú vyššiu hustotu α_2 -adrenoreceptorov. Aktivita doštičkovej NO syntázy je naopak nižšia, čo vedie k vyššej spontánnej agregácii a zvýšenej citlivosti voči agonistom [34]. Vzhľadom na výraznejšiu spoluúčasť doštičiek a endotelu na rozvoji aterosklerózy je zrejme, že terapia hypertenzie sa môže podieľať na primárnej aj sekundárnej prevencii aterosklerotických ochorení.

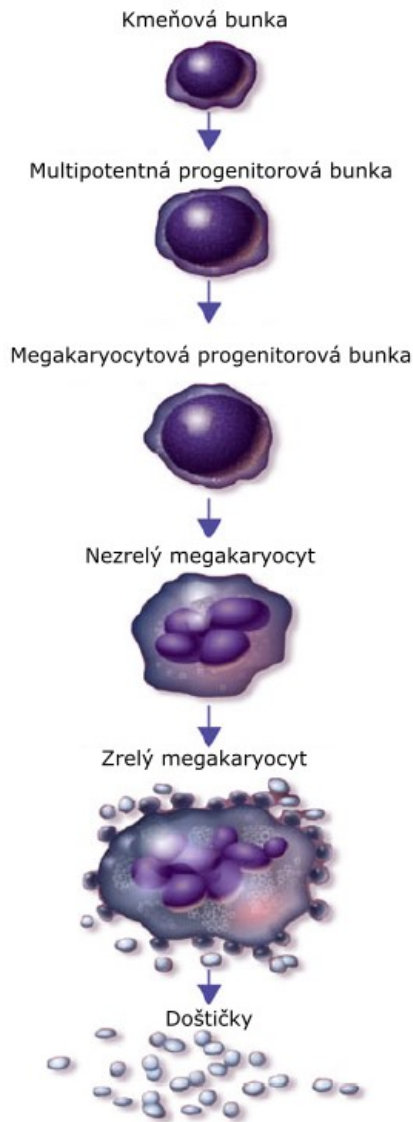
3. Ľudské doštičky

3.1. Vývoj ľudských doštičiek

Ľudské krvné doštičky sú bezjadrové bunky vznikajúce z vysoko špecializovaného prekursoru, megakaryocyty (MK). MK vzniká z krvnej kmeňovej bunky (Obr.1) a vyznačuje sa unikátnymi vlastnosťami. Tento prekursor počas diferenciácie podlieha endomitóze, čím získa 4N až 128N chromozómov. Takisto v ňom prebieha intenzívna syntéza a akumulácia proteínov a organel, ktoré sú následne využité pre tvorbu doštičiek. U MK bol taktiež identifikovaný demarkačný membránový systém, prekursor otvoreného kanalikulárneho systému (OCS, open canalicular system) nevyhnutného pre funkciu doštičiek. Po ukončení diferenciácie sa MK presunie z osteoblastovej niky, ktorá vďaka prítomnosti kolagénu I bráni tvorbe pro-doštičiek a umožňuje dozrievanie MK, do vaskulárnej niky obsahujúcej proteíny propagujúce rozpad MK (kolagén IV, fibrinogén, fibronektín, vWF) a následne dôjde k postupnému rozpadu MK, tvorbe pro-doštičiek a ich uvoľňovanie z MK do krvného obehu [35, 36]. Tento finálny proces je závislý na β_1 -tubulíne, ktorý zaisťuje reorganizáciu cytoskeletu, tvorbu pre-doštičiek a ich uvoľňovanie do obehu. Tubulín-deficientné myši produkujú o 60% menej doštičiek [37] a pacienti s mutáciou β_1 tubulínu trpia autozomálne dominantnou makrotrombocytopeniou [38]. Finálne dozrievanie doštičiek prebieha v krvnom obehu, kde sa z pro-doštičiek diferencujú funkčné doštičky. Z jedného MK takto vzniká niekoľko tisíc doštičiek [38, 39].

Dozrievanie MK môžeme rozdeliť do 2 fáz : prvou je proliferačná fáza, ktorá trvá u ľudí približne 5 dní, po nej nastane výrazne rýchlejšia genéza doštičiek, ktorá zaberie iba niekoľko hodín [35, 36, 39].

Vývoj MK je primárne kontrolovaný pomocou trombopoietínu a jeho špecifického c-Mpl receptora, avšak nie je esenciálny, nakoľko myšie modely boli schopné vytvoriť doštičky aj bez c-Mpl a trombopoietínu [40-43].



Obr. 1. Vývojové štádiá megakaryocyty. Prevzaté z Kühne & Imbach, 2010 [44].

3.2. Počet doštičiek

Životnosť doštičiek je 8-10 dní, pričom u zdravých jedincov dosahujú koncentrácií $150 - 450 \cdot 10^9$ doštičiek/liter krvi [45]. Táto koncentrácia výrazne prekračuje počet doštičiek vyžadovaný pre adekvátnu hemostázu, nakoľko spontánne krvácanie sa pri koncentráciách nad 10 000 doštičiek/liter nevyskytuje [46].

3.3. Štruktúra

Povrch doštičky je pokrytý vrstvou glykolipidov a glykoproteínov zvanou **glykokalyx**. Tento špecifický povrch dáva doštičkám negatívny náboj, čo im umožňuje sa pohybovať v krvnom riečisku v blízkosti cievnej steny bez rizika spontánnej agregácie alebo interakcie s ďalšími krvnými bunkami.

Glykoproteíny ktoré sú súčasťou glykokalyxu sú nevyhnutné pre aktiváciu a funkciu doštičiek, ako napr. receptory pre kolagén, trombín a fibrinogén [47].

Pod glykokalyxom sa nachádza **plazmatická membrána**. Hlavnými zložkami tejto membrány sú fosfatidylcholín (PC), fosfatidylserín (PS), fosfatidyletanolamín (PE), sfingomyelín (SM) a cholesterol. Rozloženie týchto zložiek je na rozdiel od majority bunkových membrán asymetrické, PS a PE sú koncentrované vo vnútornej časti membrány [48, 49]. Túto asymetrickú distribúciu, ktorá takisto zabraňuje spontánnej agregácii doštičiek, zaisťujú ATP-dependentné flipázy a flopázy [50-53]. Fosfolipidová dvojvrstva slúži ako zdroj signálnych molekúl ako diacylglycerolu, inozitol trifosfátu (IP₃), arachidónovej kyseliny (AA, z angl. arachidonic acid) a fosfatidylinozitidov. Lipidy plazmatickej membrány sú prostredníctvom oxidácie mastných kyselín takisto zdrojom energie pri aktivácii doštičiek[54].

Cytoskelet doštičiek je tvorený najmä aktínom, spektrínom a tubulínom. Aktín je hlavnou zložkou cytoskeletu a tvorí primárnu štruktúru, každá doštička obsahuje 0,55 mM tohto proteínu, čo predstavuje približne 15% celkového proteínu [55]. Táto primárna štruktúra je doplnená ďalšími proteínmi - spektrínom, tubulínom, aktinínom a filamínom. Tubulín u neaktívnych doštičiek tvorí cievku, ktorá udržiava konštantnú veľkosť a tvar doštičky. Spektrín slúži ako podpora plazmatickej membrány a kotví ju k aktínovému cytoskeletu [49].

Plazmatická membrána doštičiek je spojená s **otvoreným kanalikulárnym systémom** (OCS). OCS vznikol vychlípením plazmatickej membrány MK a slúži primárne ako sprostredkovateľ komunikácie medzi jednotlivými časťami doštičky a umožňuje transport látok. Vďaka tomu, že prechádza celou cytoplazmou, facilituje taktiež uvoľňovanie obsahu granúl. Poskytuje aj významný rezervoár plazmatickej membrány, ktorý je využívaný pri aktivácii doštičiek a nasledovnej zmene tvaru doštičky [49]. Táto vlastnosť je podstatná aj pre imunitnú funkciu doštičiek a interakciu doštičiek s patogénmi [56].

Denzný tubulárny systém (DTS) je kompartment vytváraný z endoplazmatického retikula MK. Je primárnym úložiskom Ca²⁺ a takisto v ňom prebieha syntéza prostaglandínov, ktoré sú nevyhnutné pre aktiváciu doštičky. Na rozdiel od OCS nie je spojený s plazmatickou membránou [49].

Ďalšou organelou podstatnou pre funkciu doštičiek sú **mitochondrie**. Každá doštička obsahuje niekoľko mitochondrií, ktoré produkujú energiu primárne štiepením glykogénu, ale takisto spracovaním glukózy, aminokyselín a beta-oxidáciou membránových lipidov. Okrem poskytovania energie sa takisto podieľajú na apoptóze doštičiek a tým regulujú ich životný cyklus [49, 57].

Glykogén v doštičkách dosahuje koncentrácií 0,495 ± 0,068 μM/10⁹ doštičiek [58]. Nachádza sa buď vo voľnej forme alebo je uložený v organelách – glykozómoch, alfa-granuliach a DTS (Tab 1).

V cytoplazme doštičiek sa nachádzajú 3 typy granúl, ktoré sú uvoľňované pri ich aktivácii. Tieto granuly sa líšia veľkosťou, štruktúrou a zložením (Tab. 1).

Denzné granuly - Sú najmenšími granulami, každá doštička obsahuje 3-8 týchto granúl o veľkosti 150 nm. Obsahujú najmä malé proagregačné molekuly. Nachádzajú sa v nich aj vysoké koncentrácie vápnika, horčíka, fosfátov, adenosínové nukleotidy, sérotonín a histamín. Ich účelom po vyplavení je podpora hemostázy prostredníctvom aktivácie okolitých doštičiek a vazokonstrikcie [47, 49].

Alfa granuly sú 200-500 nm veľké, kruhové až oválne telieska, ktoré sú rozmiestnené v cytoplazme. Doštička obsahuje 40 – 80 alfa granúl. Obsahujú veľké množstvo rozmanitých proteínov, ktoré sa podieľajú na koagulácii krvi (faktory V, XI, XII, fibrinogén, von Willebrandov faktor /vWF/), funkcii doštičiek, bunkovom raste, zápalových procesoch a imunitnej odpovedi. Ich špecifikom je jednovrstvová membrána obsahujúca priamo vo vnútri tejto membrány P-selektín, ktorý ale v kľudovom stave nie je exprimovaný na ich povrchu. Pri aktivácii dôjde k presunu P-selektínu na povrch. Ide teda o relatívne špecifický marker uvoľňovania alfa granúl a aktivácie doštičiek [47, 49, 59].

Lysozomy – vyznačujú sa relatívne homogénnou veľkosťou, približne 200-250 nm a obsahujú spektrum degradačných enzýmov, ktoré sa podieľajú na agregácii, koagulácii a následných reparačných procesoch [47, 49].

4. Mediátori agregácie doštičiek a ich kaskády

4.1. Tromboxán

Tromboxán A_2 je metabolit AA s krátkym biologickým poločasom (približne 30 s), ktorý je neenzymaticky konvertovaný na neaktívny tromboxán B_2 . Kvôli veľmi krátkemu biologickému poločasu účinkuje iba autokrínne a parakrínne. Receptory pre TXA_2 sú zásadné pre funkciu doštičiek, u ktorých fungujú ako mediátori pozitívnej spätnej väzby pri ich aktivácii. TXA_2 takisto má výrazné vasokonstrikčné účinky, podieľa sa aj na bronchokonstrikcii a spôsobuje kontrakciu v tenkom čreve, maternici a svaloch močového mechúra. Jeho receptory (TP) sú takisto aktivované niektorými izoprostanoidmi, ktoré vznikajú z AA vplyvom oxidatívneho stresu. Ich stabilita je ale vyššia ako TXA_2 , preto vedú k hyperstimulácii týchto receptorov a podieľajú sa na patofyziológii kardiovaskulárnych chorôb a astmy [60-62].

Tab. 1. Popis granulí trombocytov

Typ granulí	Priemerný počet	Rozmer	Obsah
Denzné	3-8	150 nm	nukleotidy, sérotonín, histamín, Ca ²⁺ , Mg ²⁺
Alfa	40-80	200-500 nm	koagulačné faktory, glykoproteíny, glykogén
Lyzozómy	0-3	200-250 nm	proteázy, glykohydrolázy

Prvým krokom metabolizmu AA v doštičkách je štiepenie fosfolipidov membrány cytozolovou fosfolipázou A₂, ktorá je aktivovaná zvýšenými hladinami cytozolového vápnika a fosforyláciou. Jej aktivitou vzniká AA, ktorá je ďalej metabolizovaná [63].

Enzýmy, ktoré metabolizujú AA sa nachádzajú v DTS doštičiek [64]. AA je prostredníctvom cyklooxygenázy 1 (COX-1) transformovaná na prostaglandíny G₂ a H₂. Prostaglandín H₂ (PGH₂) je substrát tromboxán syntázy, ktorá produkuje TXA₂. Nenasýtené mastné kyseliny, napr. kyselina eikosapentaénová sú tiež substrátmi tohto enzýmu, vznikajú z nich ale tromboxány A₃ s nižšou aktivitou ako TXA₂. Táto interakcia je považovaná za jeden z mechanizmov kardioprotektívneho účinku NMK [65, 66]. Vznikajúci TXA₂ prechádza cez plazmatickú membránu von z bunky a aktivuje TP receptor na povrchu doštičky.

Metabolit TXA₂, 11-dehydro-tromboxán B₂ (11dhTxB₂), je používaný ako marker kardiovaskulárneho rizika. Pacienti s DM 2 a akútnym koronárnym syndrómom majú vyššie hladiny 11dhTxB₂ v porovnaní so zdravými jedincami. Podávanie ireverzibilného inhibítora doštičkovej COX-1, kyseliny acetylsalicylovej (ASA, z ang. acetylsalicylic acid), znížilo hladiny tohto metabolitu [67].

Tromboxanový TP receptor je spojený s G_q a G_{12/13} proteínmi. U doštičiek aktivácia G_q receptorov aktivuje fosfolipázu C, jej aktivitou vzniká IP₃ a diacylglycerol, dochádza k vyplaveniu vápnika a aktivácii proteinkinázy C. G_{12/13} sú nutné pre zmenu tvaru doštičky [60, 62].

4.2. Kolagén

Doštičky majú viacero subtypov kolagénových receptorov, ktoré sú významné nielen pre aktiváciu a väzbu doštičiek, ale aj pre ďalšie fyziologické procesy, na ktorých sa podieľajú. Pre hemostázu sú najdôležitejšie : komplex GP Ib-IX-V a GP VI [47, 68].

GP Ib-IX-V komplex

Tento komplex je tvorený 3 podjednotkami, ktoré sú na seba nekovalentne napojené a tvoria primárny receptor pre vWF. vWF je komplexný proteín podieľajúci sa na primárnej aj sekundárnej hemostáze. Do krvného riečiska je buď syntetizovaný a následne vylučovaný bunkami cievneho endotelu alebo je syntetizovaný v MK a cirkuluje uložený primárne v alfa granuliach doštičiek. vWF musí prejsť konformačnou zmenou, aby sa na receptor naviazal, ktorá je facilitovaná pri rýchlejšom toku krvi. Naviazaním vWF takisto dôjde k signalizácii prostredníctvom GP Ib podjednotky, ktorá nakoniec vyústí v aktiváciu GP $\alpha_{Ib}\beta_{IIIa}$. Väzba doštičiek prostredníctvom tohto receptoru nepostačuje k ich adhézii k cievnej stene, ale zachytáva doštičky z obehu, ktoré sa následne pevne naviažu prostredníctvom aktivovaného GP $\alpha_{Ib}\beta_{IIIa}$. Navyše tento komplex dokáže naviazať trombín, P-selektín a Mac-1 receptor, ktorým sa k doštičkám viažu leukocyty a vytvárajú doštičkovo-leukocytové agregáty [47, 68, 69].

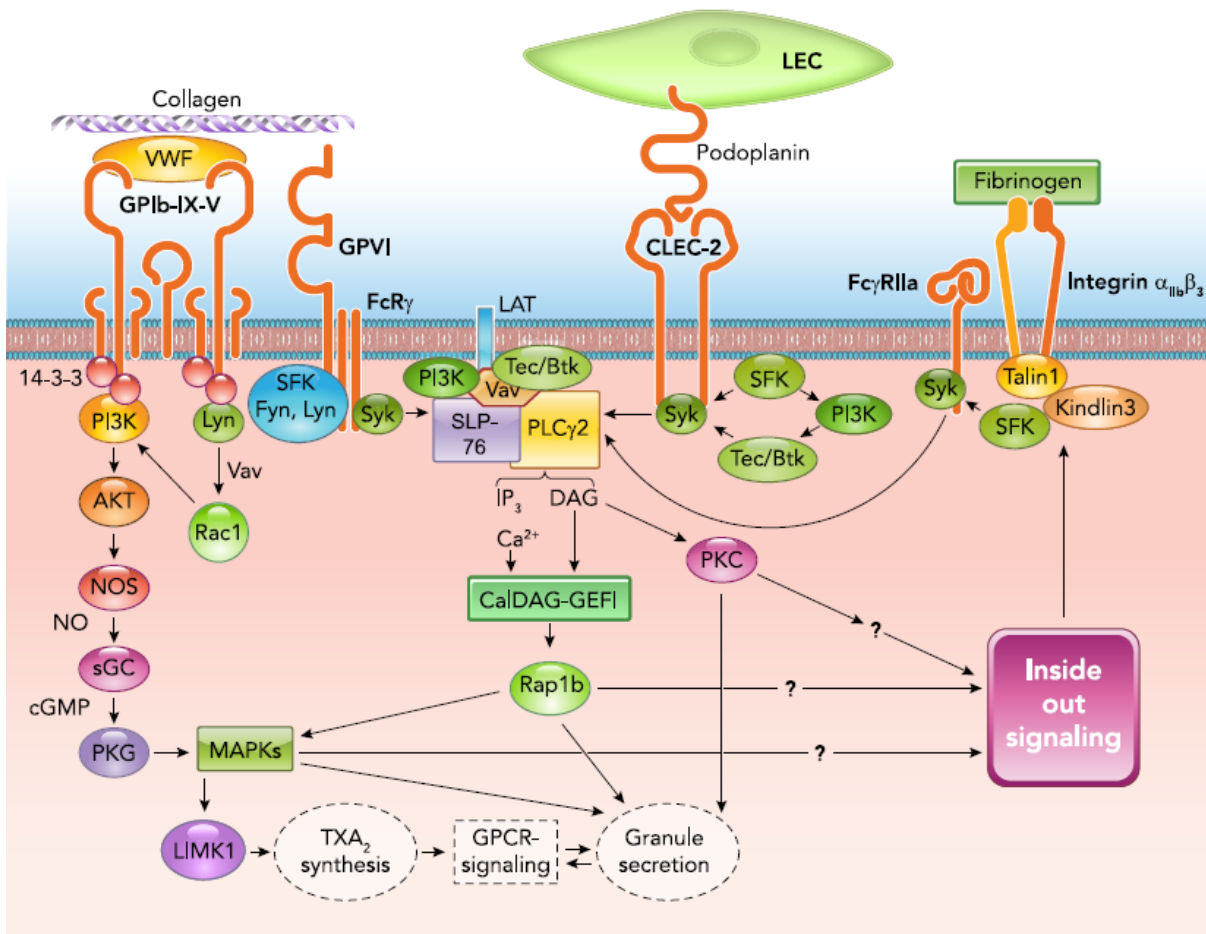
GP $\alpha_2\beta_1$

Integrín $\alpha_2\beta_1$ sa nachádza v nízkoafinitnom stave, podobne ako iné integríny. Po naviazaní kolagénu dôjde k prechodu do vysokoafinitného stavu a aktivácii signálnej kaskády, ktorá vyvrcholí aktiváciou fosfolipázy A₂ a „inside-out“ aktiváciou integrínu GP $\alpha_{Ib}\beta_{IIIa}$ [68].

GPVI

Receptor GP VI patrí medzi imunoglobulíny a je zásadný pre naviazanie doštičky k narušenej cievnej stene, jej aktivácii a finálnej tvorbe trombu. Viaže kolagén výrazne silnejšie ako vyššie spomínaný komplex GP Ib-IX-V a podieľa sa teda na adhézii a agregácii doštičiek, ktorá nastáva po prvotnom vychytávaní z obehu. Po naviazaní kolagénu na tento receptor dochádza k fosforylácii ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) domény. Nasledovná aktivácia tyrozín kináz vedie k aktivácii fosfolipázy C γ 2 (PLC γ 2). Prostredníctvom tejto dráhy dochádza k „inside-out“ aktivácii integrínových receptorov $\alpha_2\beta_1$ a $\alpha_{Ib}\beta_{IIIa}$ nutných pre tvorbu trombu [47, 68].

Kaskády dvoch hlavných kolagénových receptorov sú zobrazené v Obr. 2.



Obr. 2. Hlavné kolagénové receptory a kaskády, ktoré aktivujú.

Receptory a ich dráhy vedúce k aktivácii integrínu $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$. sGC - solubilná guanylyl cykláza; NOS - NO syntáza; SFK - kináza z rodiny SRC; LEC - lymfatická endotelová bunka; SLP-76, SH2

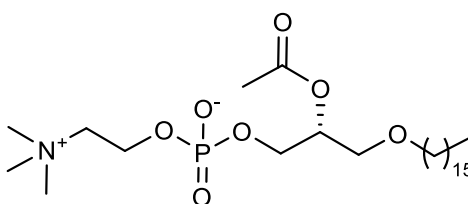
domain-containing leukocyte phosphoprotein of 76 kDa; Btk - Bruton's tyrosine kinase; Rap1b, RAS related protein 1b; MAPKs, mitogénom-aktivovaná proteín kinázy; CLEC2 - C-type lectin-like receptor 2, TXA₂ – tromboxán A₂. Prevzaté z Estevez & Du, 2017 [70].

4.3. Trombín

Trombín je proteáza nevyhnutná pre tvorbu fibrínu a efektívnu hemokoaguláciu. Doštičky s týmto proteínom interagujú prostredníctvom proteázou aktivovaných receptorov PAR 1 a PAR 4 spojenými s G-proteínom. Naviazanie na tieto receptory vedie k aktivácii PLC β . PAR -1 je citlivejší a reaguje na nižšie koncentrácie trombínu a takisto vykazuje vyššiu odolnosť voči deaktivácii prostredníctvom proteolytickej aktivity trombínu [47]. Aktiváciou tohto receptora je aktivovaná kaskáda G_q a G_{12/13} proteínov. Antagonista tohto receptora vorapaxar bol takisto nedávno schválený FDA ako antiagregačné liečivo [71].

4.4. Faktor aktivujúci doštičky (PAF, z angl. platelet activating factor)

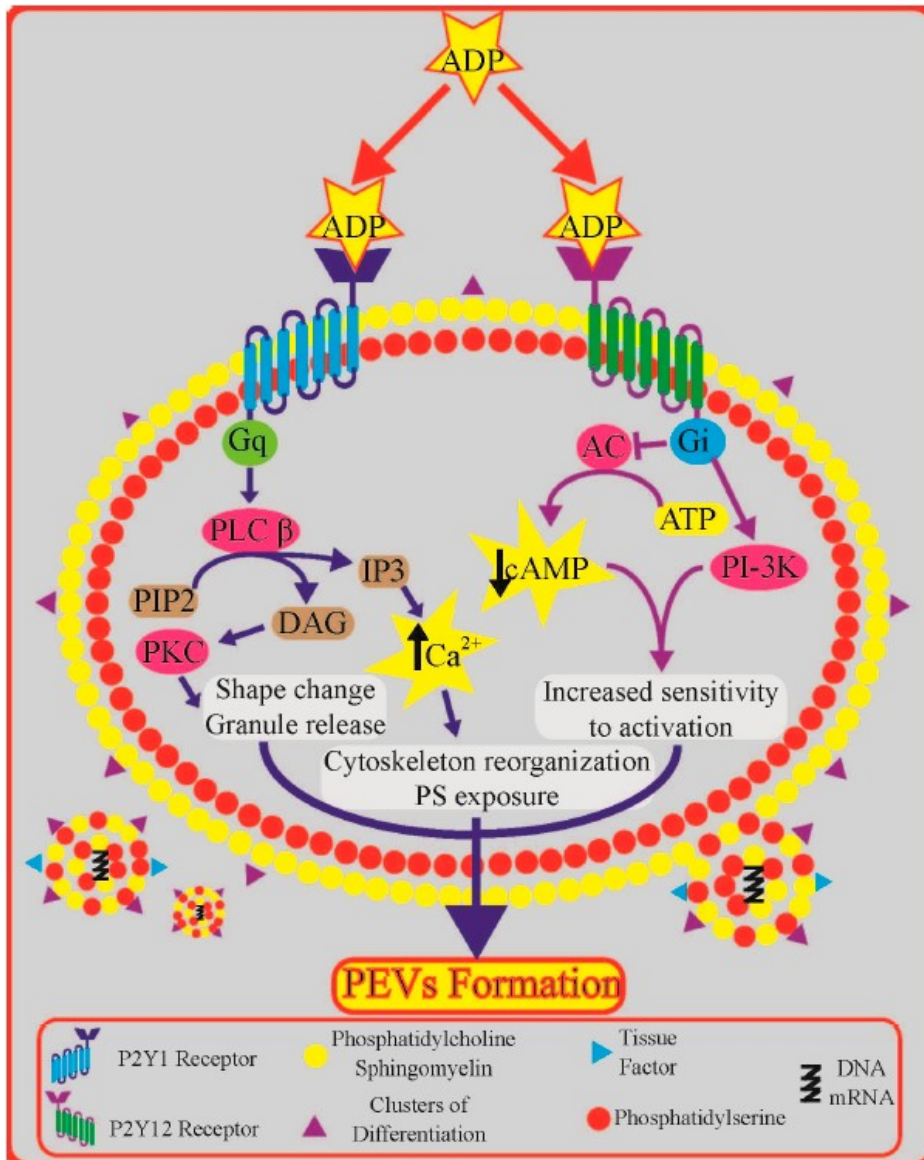
Je to fosfolipidový mediátor ((2R)-2-(acetyloxy)-3(hexadecyloxy)propyl 2 (trimetylazaniumyl)etyl fosfát, Obr.3), ktorý sa podieľa nielen na agregácii doštičiek, ale aj ďalších (pato)fyziológických procesoch vrátane zápalu, imunitnej reakcie a rakoviny. Zvýšené hladiny PAF boli detekované aj u neurodegeneratívnych ochorení ako Alzheimerovej choroby, sklerózy multiplex a ischemicko-reperfúzneho poškodenia mozgu [72-74].



Obr.3. Štruktúra PAF

4.5. Adenozín difosfát (ADP)

ADP je primárne uložený v denzných granulách doštičiek a na agregácii sa podieľa prostredníctvom 2 receptorov na povrchu doštičiek : P2Y₁ a P2Y₁₂ (Obr.4). Väzba na oba receptory je nutná k plnej aktivácii doštičky, každý je ale spojený s iným G-proteínom. P2Y₁ je receptor spojený s G_q a navodzuje reverzibilnú agregáciu a zmenu tvaru doštičky. Táto prvotná aktivácia je následne zosilnená a vznikajúci agregát je stabilizovaný prostredníctvom receptoru P2Y₁₂, ktorého G_i aktivita je jedným z využívaných terapeutických cieľov. Antagonisti P2Y₁₂ sú jednými z najčastejšie používaných antiagregačných liečiv [47, 75].



Obr 4. Transdukcia signálu prostredníctvom ADP receptorov. AC—adenylát cykláza; ADP—adenozín difosfát; ATP—adenozín trifosfát; cAMP—cyklický adenosín monofosfát; Ca²⁺—vápenaté ióny; DAG—diacylglycerol; IP3—inositol trisfosfát; PIP2—Fosfatidylinositol bisfosfát; PI3-K—fosfoinozítid 3-kináza; PKC—proteín kináza C. Prevzaté z Gąsecka et al., 2020 [76].

4.6. Glykoproteín $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ (známy tiež ako GPIIb-IIIa)

Glykoproteín $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ je najviac exprimovaným receptorom doštičiek v počte približne 40000 kópií na jednu doštičku. Je to receptor zásadný pre agregáciu a signalizáciu doštičiek. Viazá na seba viacero hemostatických proteínov vrátane fibrinogénu (faktor I), protrombínu (faktor II), vWF, fibronektínu a vitronektínu. $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$ je udržiavaný v nízkoafinitnom stave, v dôsledku „inside-out“ signalizácie (prostredníctvom vWF, ADP, trombínu, kolagénových receptorov, proteínkinázy C) prebieha konformačná zmena a receptor prejde do vysokoafinitného stavu, ktorý umožní adhéziu a agregáciu doštičiek a tvorbu krvnej zrazeniny [47, 77].

5. Agregáčná kaskáda

Pri poškodení cievnej steny sa subendotelové štruktúry dostanú do kontaktu s tečúcou krvou. Najrozšírenejší, a pre hemostázu najvýznamnejší proagregačný proteín, je kolagén. Vyskytuje sa vo viac ako 20 izoformách, pričom izoformy I a III sú v cievnej stene najrozšírenejšie. Kolagén tvorí približne 40% celkového proteínu v krvných cievach a podieľa sa na udržiavaní integrity a elasticity cievnej steny [68]. Doštičky sa viažu na kolagén priamo, prostredníctvom 2 hlavných glykoproteínových receptorov: GP $\alpha_2\beta_1$ a GP VI (viac viz. predchádzajúca kapitola). Väzba na tieto receptory je ale relatívne pomalá, preto pri zvýšenom prietoku krvi nestačí k adhézii doštičky ani väzba na oba tieto receptory. K úspešnej adhézii je nutná väzba na receptorový komplex GP Ib-V-IX, ktorého primárny ligand je vWF. vWF sa viaže na exponovaný kolagén, čím dôjde k jeho štruktúrnej zmene, ktorá umožní väzbu doštičky prostredníctvom GP Ib. Táto interakcia spomaľuje doštičky a umožňuje tvorbu pevnejších väzieb medzi kolagénom a GP $\alpha_2\beta_1$ a GP VI a následne úspešnú adhéziu doštičiek. Pri nižšom prietoku prebieha väzba prostredníctvom GP $\alpha_2\beta_1$ a GP VI, po ktorej nasleduje aktivácia doštičiek [47, 68]. Pre optimálnu adhéziu je nutná spolupráca oboch spomínaných kolagénových receptorov. Kolagénové aj ďalšie receptory zúčastňujúce sa na procese agregácie sú zhrnuté v Tab.2.

Aktivácia fosfolipáz spôsobí zvýšenie intracelulárneho vápnika a aktiváciu proteínkinázy C a vyplavenie granúl, v ktorých obsiahnutí mediátori aktivujú okolité doštičky prostredníctvom ADP a TXA_2 . Táto amplifikácia je sprostredkovaná receptormi spojenými s G proteínom.

IP_3 , ktorý vzniká aktivitou fosfolipázy C, otvorí vápnikové kanály v DTS a spôsobí vtok vápnika do cytoplazmy. Vyplavenie vápnikového depa aktivuje senzor STIM 1, ktorý interaguje s membránovými vápnikovými kanálmi, primárne Orai1 a CRAC, výsledkom je vtok vápnika dovnútra bunky.

Diacylglycerol, ďalší produkt fosfolipázy C spolu s vápnikom vedie k aktivácii proteínkinázy C (PKC).

PKC fosforyluje široké spektrum substrátov, výsledkom tejto aktivity je stimulácia doštičiek a sekrécia alfa a delta granúl.

Pri aktivácii doštičiek dôjde aj k zmene distribúcie lipidov plazmatickej membrány, ktorá má význam nielen pre agregáciu doštičiek, ale aj pre väzbu vápnika a koagulačných faktorov.

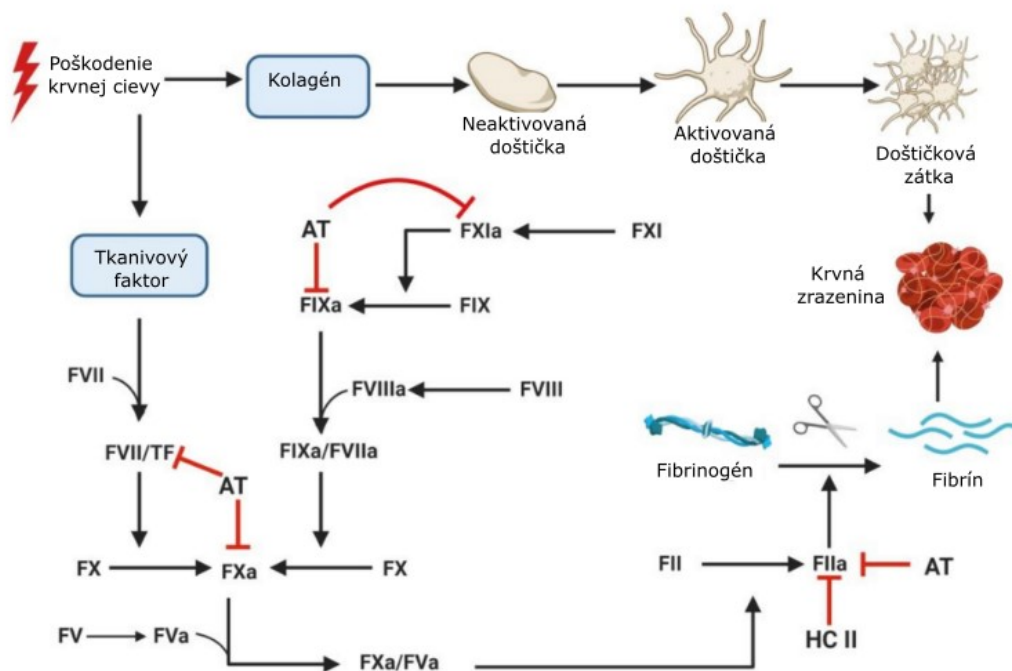
Po úspešnej adhézii a aktivácii doštičiek nasleduje ich finálna agregácia a tvorba trombu (Obr.5). Agregácia doštičiek je sprostredkovaná integrínom $\alpha_{IIb}\beta_3$, ktorý prechádza pri aktivácii doštičky z kľudového nízkoafinitného stavu do stavu vysokoafinitného, a ktorý potom viaže kolagén a fibrinogén.

Tab.2. Receptory zúčastňujúce sa na agregáčnom procese

Receptor	Ligand	Typ	Efekt
GP $\alpha_2\beta_1$	Kolagén	Integrín	PLA ₂
GPVI	Kolagén	ITAM	PLC γ 2
GP Ib-V-XI	Kolagén	Integrín	PLC γ 2, PI3K, PKG, MAPK
PAR	Trombín	G _{12/13} , G _q	PLC β , RhoA
TXR	Tromboxán	G _{12/13} , G _q	PLC β , RhoA
P2Y ₁	ADP	G _q	Intracelulárne vyplavenie Ca ²⁺
5-HT ₂	Sérotonín	G _q	PLC β
P2Y ₁₂	ADP	G _i	PI3K
PAF-R	PAF	G _q	PKC

ITAM– immunoreceptor tyrosine-based activation motif, PI3K–fosfoinozítid 3-kináza, PLA₂– fosfolipáza A₂, PLC– PKC–proteín kináza C, PKG–proteín kináza G, MAPK–mitogénom aktivovaná proteín kináza, RhoA-Ras homolog family member A

Nenarušený endotel naopak zabraňuje aktivácii doštičiek, a to prostredníctvom viacerých mechanizmov. Bunky endotelu produkujú oxid dusnatý, ktorý okrem vazodilatačného efektu takisto inhibuje aktivitu doštičiek. Prostacyklín, ktorý je taktiež produkovaný endotelom, inhibuje agregáciu prostredníctvom svojho G_s receptoru, aktivuje adenylátcyklázu a zvyšuje produkciu cAMP, primárneho inhibičného mediátora vo vnútri doštičiek. Enzýmy CD₃₉/CD₇₃ exprimované na povrchu endotelu metabolizujú uvoľňované ADP, čím zabraňujú aktivácii doštičiek prostredníctvom P2Y₁ a P2Y₁₂.



Obr.5. Hemokoagulačná kaskáda. Upravené podľa Dwivedi & Pomin, 2020 [78].

6. Antiagregačná terapia

Liečivá ovplyvňujúce funkciu a reaktivitu doštičiek sú používané najmä pri sekundárnej prevencii trombotických príhod. V súčasnosti je najrozšírenejším liečivom ASA, ktorá je považovaná za zlatý štandard antiagregačnej terapie. Bohužiaľ bola u tohto liečiva popísaná nedostatočná odpoveď na terapiu, označovaná aj ako aspirínová rezistencia. Definícia a mechanizmus tohto fenoménu ešte nie je definitívne objasnená. Môže byť spôsobená viacerými faktormi, napr. je spájaná s hyperlipidémiou, nakoľko izoprostány vznikajúce oxidáciou LDL dokážu aktivovať AA kaskádu bez účasti COX [79]. Túto hypotézu potvrdzuje aj fakt, že u týchto pacientov boli detekované vyššie hladiny metabolitu TXA_2 , a teda k aktivácii tejto dráhy dochádzalo aj napriek používaniu ASA a inhibícii COX-1 [80]. Efektivita ASA je takisto znížená pri použití enterosolventných tabliet alebo pri súčasnom používaní inhibítorov protónovej pumpy. Toto pozorovanie je pravdepodobne spojené s deacetyláciou ASA na kyselinu salicylovú pri vyšších pH, ktoré sa v žalúdku bežne nevyskytujú [81, 82]. Terapia ASA je takisto neodporúčaná u pacientov s alergickými ochoreniami, astmou a počas tehotenstva [83].

Druhou najpoužívanejšou skupinou perorálne podávaných antiagregačných liečiv sú antagonisti receptora P2Y₁₂.

Tiklopidín je liečivom prvej generácie thienopyridínov, irreverzibilných antagonistov P2Y₁₂ receptora. Je to perorálne podávané proliečivo, preto je u neho vysoké riziko liekových interakcií, prípadne neúčinnosti terapie u rýchlejších metabolizátorov. Dnes je takmer nepoužívaný kvôli riziku závažných nežiaducich účinkov [84, 85].

Klopidogrel patrí do druhej generácie thienopyridínov. Je to takisto proliečivo, takže je nutné zohľadniť pri jeho užívaní možnosť interakcií a farmakogenomické parametre, aj napriek tomu je ale momentálne najpoužívanejší P2Y₁₂ antagonista [85].

Prasugrel sa zaraďuje do tretej generácie thienopyridínov. Jeho výhodami je nižšia miera interakcií, lepší nástup účinku a menšia závislosť na biotransformačných enzýmoch [85, 86].

Ticagrelor patrí do novej podskupiny týchto liečiv. Nie je to proliečivo a jeho mechanizmom účinku je reverzibilná inhibícia P2Y₁₂ signalizácie. Klinické štúdie neukázali vyššiu účinnosť v porovnaní s thienopyridínmi, v určitých indikáciách je ale preferovaný pred klopidogrelom [84, 85, 87].

Vzhľadom na odlišné mechanizmy účinku týchto 2 skupín liečiv sa začali kombinovať pri sekundárnej prevencii. Použitie duálnej antiagregačnej liečby (Dual antiplatelet therapy) je v klinickej praxi zavedené typicky po aplikácii stentu, dĺžka tohto typu farmakoterapie vo väčšine prípadov by ale nemala prekročiť 1 rok [87, 88].

Kombinácia ASA a dipyridamolu, inhibítora fosfodiesterázy 3, preukázala podobnú účinnosť ako terapia ASA pri použití nižších dávok ASA. Bezpečnostný profil tejto kombinácie je podobný ASA, určitá časť pacientov ale bola nútená terapiu prerušiť z dôvodu výrazných bolestí hlavy. Táto kombinácia nie je príliš preferovaná, bol ale preukázaný jej benefit v porovnaní s ASA monoterapiou u pacientov po mozgovej mŕtvici [89].

Paleta perorálnych liečiv bola nedávno rozšírená o antagonistu PAR 1 receptora, vorapaxaru, ktorý je momentálne schválený FDA pre použitie v kombinácii s ďalšími antiagreganciami. Vorapaxar bol ale stiahnutý z európskeho trhu v januári 2015 z dôvodu zvýšeného rizika krvácania [90].

Pri akútnej intervencii je v súčasnosti k dispozícii kangrelor, rýchlo účinkujúci, i.v. podávaný a reverzibilný P2Y₁₂ antagonista a vysoko účinní antagonisti glykoproteínu $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$. U druhej spomínanej skupiny je vzhľadom na nutnosť intravenózneho podania a vysokú účinnosť spojenú s vysokým rizikom krvácania je ich využitie obmedzené na akútne intervencie pri vysokom trombotickom riziku alebo „no-reflow“ syndróme [84].

Zoznam antiagregačných liečiv je v Tab. 3

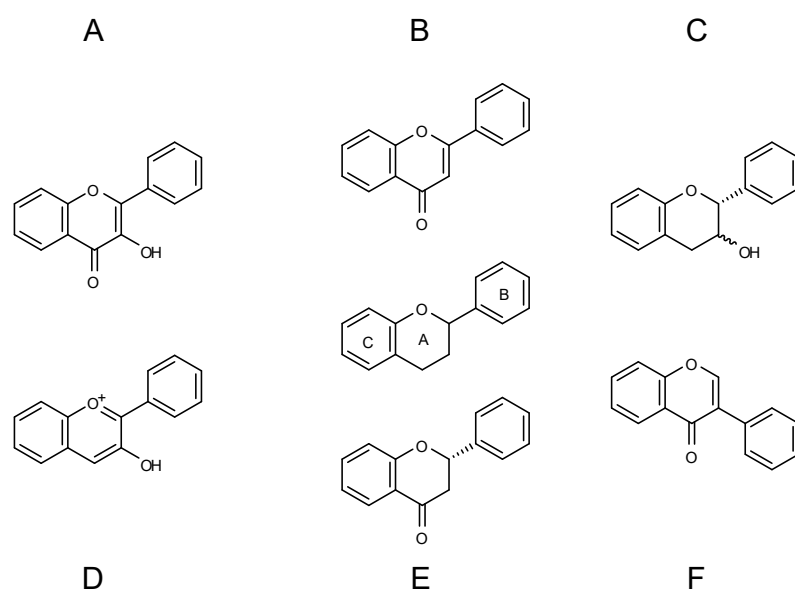
Tab. 3 Klinicky používané antiagregačné liečivá

Liečivo	Podanie	Mechanizmus účinku
Acetylsalicylová kyselina	p.o.	Ireverzibilná inhibícia COX
ASA+dipyridamol	p.o.	Ireverzibilná inhibícia COX + inhibícia PDE 3
Tiklopidín, klopido­grel, prasugrel	p.o.	Ireverzibilný antagonizmus P2Y ₁₂
Ticagrelor	p.o.	Reverzibilný antagonizmus P2Y ₁₂
Vorapaxar	p.o.	Antagonizmus PAR 1
Kangrelor	i.v.	Reverzibilný P2Y ₁₂ antagonista
Eptifibatid, abciximab, tirofiban	i.v.	Antagonizmus GP α _{IIB} β _{IIIa}

COX – cyklooxygenáza, PDE – fosfodiesteráza

7. Flavonoidy

Flavonoidy patria medzi polyfenoly (Obr.6), sekundárne metabolity rastlín, ktoré majú široké spektrum fyziologických funkcií vrátane bunkového delenia, rastu, produkcie hormónov a reakcii na stres. Biosyntéza polyfenolických látok prebieha prostredníctvom šikimátovej/fenylpropánovej metabolickej dráhy [91].



Obr.6. Štruktúra flavonoidov. A - flavonol, B - flavón, C - flavanol, D - antokyanidín, E - flavanón, F – izoflavón. Všeobecná štruktúra flavonoidov vrátane označenia jednotlivých kruhov je umiestnená uprostred

Štúdie kvantifikujúce príjem polyfenolov z potravy ukázali výraznú variabilitu (Tab. 4), ktorá je spojená s typickým zložením stravy v danom regióne [92-98].

Tab 4. Príjem polyfenolov v potrave u dospeljej populácie

Krajina	Príjem polyfenolov v potrave	Referencia
USA	884 ±20 mg na 1 000 kcal/d	[93]
Japonsko	567 ± 236 mg/d	[92]
Brazília	1199 mg/d	[97]
Francúzsko	820 ± 335 mg/d	[94]
Fínsko	863 ± 415 mg/d	[95]
Spojené Kráľovstvo	1080 mg/d	[96]
Kórea	318 mg/d	[98]

Tab 5. Obsah polyfenolických látok vo vybraných potravinách

Potravina	Obsah polyfenolov mg/100 g(ml)
Horká čokoláda	1664
Ľanové semienko	1528
Čierne ríbezle	758
Sladká čerešňa	274
Mliečna čokoláda	236
Jahoda	235
Jablko	136
Čierny čaj	102
Červené víno	101
Káva	214
Pivo	22

Upravené podľa [99]

Konzumácia potravín obsahujúcich relatívne veľké množstvo polyfenolických látok (Tab. 5) je spájaná s prospešnými účinkami pre ľudské zdravie. Dostupné štúdie síce potvrdzujú túto hypotézu, väčšina týchto štúdií ale používala heterogénne extrakty. Tieto extrakty sú bohaté na polyfenoly, ale vzhľadom na to, že nebola vykonaná detailná analýza ich zloženia a biodostupnosti, je problémom identifikovať, ktorá ich zložka je za tieto benefity zodpovedná. Pozitívne účinky na kardiovaskulárne zdravie, diabetes a neurodegeneratívne ochorenia, ale aj protizápalové a protirakovinové pôsobenie boli pozorované napríklad u hrozna, zeleného čaju, olivového oleja a ďalších potravín bohatých na polyfenolické látky [100-112].

7.1. Flavonoidné metabolity

Flavonoidy ktoré sa v potrave vyskytujú vo forme glykozidov môžu byť v tenkom čreve rozložené buď v lumene prostredníctvom laktáza phloridzin hydrolázy alebo pomocou cytozolovej β -glukozidázy. Aglykóny sú v malej miere pasívne absorbované a podliehajú reakciám prvej a druhej fázy biotransformácie. U ľudí bola pozorovaná preferencia pre reakcie druhej fázy, teda konjugáčnej reakcie, ktorá prebieha už v črevnej sliznici [113]. Po prestupe do enterocytu prebieha buď glukuronidácia v endoplazmatickom retikule, sulfatácia prostredníctvom cytozolových sulfotransferáz, prípadne metylácia pomocou katechol-O-metyltransferázy, ktorá sa vyskytuje v cytozolej forme aj viazaná na membrány endoplazmatického retikula [114, 115]. Fenolické látky s nízkou molekulovou hmotnosťou podliehajú konjugáčnym reakciám aj v mitochondriách, u ľudí je preferovaná konjugácia s glycínom alebo glutamínom [116]. Tieto metabolity sú nasledovne transportované do systémovej cirkulácie, alebo dochádza k ich spätnému effluxu, ako bolo popísané napr. u epikatechínu [117]. Analogicky je to u ďalšej fenolickej látky, resveratrolu, u ktorej reakcie druhej fázy prebiehajú primárne v čreve a jeho metabolity sú následne transportované aktívnymi transportérmi ako breast cancer resistance protein a multidrug resistance associated protein 3 naspäť do lumenu tráviaceho traktu [118].

Na rozdiel od izoflavonoidov, ktoré sú schopné po perorálnom podaní dosiahnuť významné plazmatické hladiny, biodostupnosť flavonoidov *per os* je vo všeobecnosti veľmi nízka. Glykozidy flavonoidov majú vyššiu biodostupnosť závislú na vlastnostiach naviazanej cukornej zložky, ale ani tieto látky nedosahovali dostatočné plazmatické hladiny. V prípade kvercetínu, monoglykozidy mali výrazne vyšší prestup cez črevnú stenu než aglykón vďaka transportu prostredníctvom glukózového SGLT1 transportéru [119].

V prípade flaván-3-olov prítomných v zelenom čaji bolo preukázané, že biodostupnosť (epi)katechínu je výrazne vyššia než u väčšiny flavonoidov, v tomto prípade je teda miera črevného metabolizmu nižšia. Pomer (epi)katechínu detekovaného v plazme a v moči ukázal, že v plazme a tkanivách prebieha extenzívny metabolizmus, pravdepodobne aj enterohepatálna recirkulácia.

Flavonoidy, ktoré neprejdú do enterocytu spolu s ich konjugátmi, ktoré sú spätne transportované do tráviaceho traktu, pokračujú do hrubého čreva, kde sú metabolizované na veľké množstvo jednoduchých metabolitov. Glykozidy, ktoré neboli rozštiepené ľudskými enzýmami ako napr. rhamnóza, sú štiepené črevnou mikroflórou na aglykóny. Aglykóny sú potom ďalej štiepené prostredníctvom črevnej mikroflóry na malé fenolické metabolity, čo demonštroval vo svojej štúdií Roowi et al. so zdravými a ileostomizovanými pacientmi. Niektoré z týchto metabolitov dosahovali značných hladín aj v moči pacientov, čo potvrdzuje absorpciu v hrubom čreve po rozklade parentných flavonoidov [120]. Túto teóriu podporuje aj práca Sanchez et al., ktorý po podaní zeleného čaju vo výkaloch nedetekoval štatisticky významný nárast v koncentrácii flavonoidných metabolitov [121].

Miera metabolizmu črevnou mikroflórou a metabolity, ktoré vznikajú sú závislé na štruktúre parentného polyfenolu, významná časť je ale týmto spôsobom štiepená na malé fenolické metabolity[122, 123].

U štúdií, ktoré používali plody bobúľ boli v plazme aj moči detekované významne zvýšené hladiny 4-methylkatecholu a jeho konjugátov [112, 124-128]. V prípade 4-methylkatechol sulfátu plazmatické hladiny dosahovali 161 – 3 497 nM. U 4-methylkatecholu boli popísané rozmanité biologické účinky s použitím *in vitro* aj *in vivo* techník (Tab.6).

Tab. 6. Účinky 4-methylkatecholu v biologických systémoch

CNS	Ovplyvnenie NGF (neural growth factor) a BDNF (brain derived neurotrophic factor)	↑ BDNF mRNA, BDNF – LI, obsah BDNF	[129-131]
		↓ odumretých spirálnych gangliových neurónov	
	Obnova nervov po úraze/poškodení	↑ zotavenie po chemicky alebo mechanicky navodenom poškodení nervov	[132-135]
		Zvieracie modely	↑ zlepšenie priestorovej orientácie a pamäte
↓ depresívnych symptómov, chronickej bolesti			
Pankreatické bunky		↓ viability inzulínu, apoptózy β-buniek, pankreatickej kaspázy 3	[139-141]
		↑ expresie NGF, aktivity antioxidantných enzýmov	
Oxidačný stres		↑ expresia HO-1, aktivácia NRF-2 dráhy	[142-144]
		↓ proliferácie melanómových buniek, H ₂ O ₂ indukovaného odumretia buniek, oxidačného stresu	
Kardiovaskulárny systém		↑ expresie CSRP-3, relaxácia artérií, prežitia, hmotnosti, funkcia srdca	[111, 145-147]
		↓ krvného tlaku, agregácie doštičiek	

BDNF-LI – brain derived neurotrophic factor like immunoreactivity, NRF-2 - Nuclear factor erythroid -related factor 2, HO-1 – hem oxygenáza 1, CSRP -3 - cysteine and glycine-rich protein 3

8. Cieľ práce

Cieľom tejto dizertačnej práce bolo testovanie antiagregačnej aktivity malých fenolických metabolitov polyfenolických látok a analógov 4-metylkatecholu a definovanie mechanizmu účinku najúčinnějších látok. Takisto bola overená účinnosť 4-metylkatecholu s využitím heterogénnej populačnej vzorky zdravých darcov.

9. Recenzované odborné publikácie vzťahujúce sa k téme dizertačnej práce

9.1. 4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects

Applová, L., Karlíčková, J., Warncke, P., Macáková, K., **Hrubša, M.**, Macháček, M., Tvrдый, V., Fischer, D., Mladěnka, P. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2019, 63, 1900261.

IF₂₀₁₉ = 5, 309; IF-Q: Q1; AIS-Q: D1, wQ1

V tejto publikácii bolo otestovaných 29 látok patriacich do skupiny malých fenolických metabolitov polyfenolov. U najúčinnjších látok, pyrogalolu a 4-MC, bol takisto skúmaný ich mechanizmus účinku a ich efekt bol potvrdený za použitia nového *ex ovo* trombotického modelu. Tento model využíva kuracie embryá v rannom štádiu vývoja, ktoré disponujú trombocytmi a primitívnym kardiovaskulárnym systémom a je ním teda možné študovať účinky látok na hemostázu.

Publikácia je dostupná buď v tlačenej forme dizertačnej práce alebo online:

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201900261>

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

Migkos, T., Applová, L., Horký, P., Tvrдый, V., Karlíčková, J., Macáková, K., **Hrubša, M.**, Catapano, M.C., Tomanek, M., Pour, M., Mladěnka, P. *Phytomedicine*, 2019, 62, 152974.

IF₂₀₁₉ = 4, 268; IF-Q: D1, D1, Q1, Q1; AIS-Q: D1, Q1, Q2, Q2; wQ2

Tento článok bol zameraný na mikrobiálne metabolity izoflavonoidov a ich efekt na agregáciu krvných doštičiek a oxidáciu prechodných kovov. U S-equolu a 4-etylphenolu bola spozorovaná biologicky relevantná antiagregačná aktivita a bol skúmaný ich mechanizmus účinku.

Publikácia je dostupná buď v tlačenej forme dizertačnej práce alebo online:

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152974>

9.3. The Effect of Silymarin Flavonolignans and Their Sulfated Conjugates on Platelet Aggregation and Blood Vessels Ex Vivo

Pourová, J.; Applová, L.; Macáková, K.; Vopršalová, M.; Migkos, T.; Bentanachs, R.; Biedermann, D.; Petrásková, L.; Tvrký, V.; **Hrubša, M.**; Karlíčková, J.; Křen, V.; Valentová, K.; Mladěnka, P. *Nutrients*, 2019, 11, 2286.

IF₂₀₁₉ = 4, 546; IF-Q:–Q1; AIS-Q: Q2; wQ2

Silymarín je komplex flavonolignánov, ktorý má podľa niektorých štúdií pozitívne účinky na kardiovaskulárny systém. V tejto publikácii bol skúmaný účinok jednotlivých zložiek silymarínového komplexu a ich metabolitov na agregáciu krvi a tonus krvných ciev. Bolo identifikovaných niekoľko vazorelaxačných látok, ich efekt na agregáciu krvi bol ale zanedbateľný.

Publikácia je dostupná buď v tlačenej forme dizertačnej práce alebo online:

<https://doi.org/10.3390/nu11102286>

9.4. Synthesis of 3,3-dimethyl-6-oxopyrano[3,4-c]pyridines and their antiplatelet and vasodilatory activity

Sirakanyan, N.S.*, **Hrubša, M.***, Spinelli, D., Dias, P., Kartsev, K., Carazo, A., Hovakimyan, A.A., Pourová, J., Hakobyan, E.K., Karlíčková, J., Parvin, S., Fadraersada, J., Macáková, K., Geronikaki, A., Mladěnka, P. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2022, 74, 6, 887–895.

*Authors contributed equally to this study

IF₂₀₂₁ = 4, 810; IF-Q: Q2; AIS-Q: Q3, wQ3

V spolupráci so zahraničnými inštitúciami bola syntetizovaná séria 6-oxopyrano[3,4-c]pyridínov a otestovaná ich antiagregačná a vazodilatačná aktivita. V tejto publikácii boli takisto zavedené nové metodiky pre skúmanie mechanizmu antiagregačnej aktivity, ktoré boli využité v ďalších štúdiách zahrnutých do tejto dizertačnej práce.

Publikácia je dostupná buď v tlačenej forme dizertačnej práce alebo online:

<https://doi.org/10.1093/jpp/rgab075>

9.5. Comparison of Antiplatelet Effects of Phenol Derivatives in Humans

Hrubša, M.; Alva, R.; Parvin, M.S.; Macáková, K.; Karlíčková, J.; Fadraersada, J.; Konečný, L.; Moravcová, M.; Carazo, A.; Mladěnka, P. *Biomolecules*, 2022, 12, 117.

IF₂₀₂₁ = 6, 064; IF-Q: Q2; AIS-Q: Q2; wQ2

Tento článok skúmal antiagregačnú a antikoagulačnú aktivitu 22 látok, ktoré boli štruktúrne odvodené od 4-MC s účelom sledovať vzťah štruktúry a účinku. Takisto bola otestovaná ich toxicita za použitia viacerých *in vitro* metód.

Publikácia je dostupná buď v tlačenej forme dizertačnej práce alebo online:

<https://doi.org/10.3390/biom12010117>

9.6. The Antiplatelet Effect of 4-Methylcatechol in a Real Population Sample and Determination of the Mechanism of Action

Hrubša, M.; Konečný, L.; Paclíková, M.; Parvin, M.S.; Skořepa, P.; Musil, F.; Karlíčková, J.; Javorská, L.; Matoušová, K.; Krčmová, L.K.; Carazo, A.; Šmahelová, A.; Blaha, V.; Mladěnka, P. *Nutrients*, 2022, 14, 4798.

IF₂₀₂₁ = 6, 706; IF-Q: Q1; AIS-Q: Q2; wQ2

Táto publikácia mala 2 hlavné ciele: potvrdenie účinku 4-MC na heterogénnej vzorke 53 zdravých darcov a ďalšie detailné skúmanie mechanizmu účinku 4-MC.

Publikácia je dostupná buď v tlačenej forme dizertačnej práce alebo online:

<https://doi.org/10.3390/nu14224798>

10. Komentár k vybraným publikáciám

Príjem polyfenolických látok v potrave je spojený s prospešnými účinkami na ľudské zdravie, v tejto práci som sa zamerlal na ich vplyv na kardiovaskulárny systém s dôrazom na hemostázu. Dysregulácia hemostázy môže viesť k veľmi vážnym akútnym stavom, ako napríklad infarkt myokardu alebo mŕtvica. Viacero epidemiologických štúdií poukázalo na koreláciu medzi príjmom stravy so zvýšeným obsahom polyfenolov a nižšou incidenciou civilizačných ochorení, polyfenoly boli teda považované za látky zodpovedné za tieto pozitívne účinky. Vzhľadom na ich extrémne nízku biodostupnosť nie je možné dosiahnuť plazmatické koncentrácie, ktoré by vysvetľovali pozorované biologické dôsledky ich príjmu v potrave. Tento fenomén je ale možné vysvetliť rozsiahlym metabolizmom polyfenolických látok, ktorý prebieha v lumene tráviaceho traktu. V tenkom čreve je časť polyfenolov síce absorbovaná, väčšina prijatých polyfenolov je ale deglykozylovaná na príslušný aglykon a postupuje do hrubého čreva, kde prebieha jeho spracovanie črevnou mikroflórou. Bakteriálne enzýmy sú schopné štiepiť kostru polyfenolov na niekoľko skupín malých fenolických metabolitov. Tieto malé fenolické látky majú výrazne vyššiu biodostupnosť ako parentné polyfenoly a dosahujú biologicky relevantné plazmatické koncentrácie, niektoré z nich jednotky až desiatky μM ako napr. kyselina hippurová alebo katechol-O-sulfát. U 4-metylkatechol sulfátu bol dokumentovaný výrazný nárast v plazmatických hladinách aj exkrécii tohto metabolitu po príjme stravy bohatej na polyfenoly a dosahoval plazmatické koncentrácie až $3,5 \mu\text{M}$ [112, 125-128]. Súčasný výskum sa preto zamerlal práve na vyššie spomínané malé fenolické metabolity, nakoľko niektoré z nich môžu byť zodpovedné za zdravotné benefity stravy bohatej na polyfenoly.

Aj napriek nízkej celkovej biodostupnosti polyfenolických látok je časť z nich deglykozylovaná v tenkom čreve a následne absorbovaná, prípadne dochádza k transportu celého glykozidu, pravdepodobne za pomoci transportérov v lumene čreva. V bunkách črevnej steny podliehajú tieto látky konjugačným reakciám a tieto produkty 2. fázy biotransformácie nasledovne prechádzajú do krvného obehu. Efekt niekoľkých metabolitov tohto typu bol hodnotený v našej publikácii Pourová et al. /publikácia č. 3 tejto dizertačnej práce/. V tejto práci boli vyhodnotené účinky purifikovaných zložiek silymarínového komplexu a ich sulfátov, typických konjugačných metabolitov, na agregáciu krvných doštičiek a relaxáciu ciev. U silymarínu boli popísané účinky na kardiovaskulárny systém, dostupné štúdie ale vo väčšine prípadov buď používali silymarínový komplex, alebo iba malé množstvo látok v ňom obsiahnutých [148-154]. Mechanizmus účinku 2 najúčinnějších látok (silybínu B a 2,3-dehydrosilybínu) bol primárne spojený s antagonizmom na tromboxánových receptoroch. Sulfáty flavonolignánov nepreukázali výraznú antiagregačnú aktivitu, avšak disponovali podobnou vazodilatačnou aktivitou ako parentné látky. Vzhľadom na tieto pozorovania je pravdepodobné, že

pozitívne efekty silymarínového komplexu sú sprostredkované ich vazorelaxačnou aktivitou, nakoľko antiagregačná aktivita týchto látok bola v našich experimentoch výrazne nižšia.

V ďalších publikáciách sme sa zamerali na malé fenolické metabolity a ich efekt na krvné doštičky a hemostázu. V publikácii Migkos et al. /publikácia č. 2 tejto dizertačnej práce/ sme zacielili na metabolity izoflavonoidov a ich efekt na agregáciu plnej krvi a ich interakciu s prechodnými kovmi. Najúčinnjšími metabolitmi boli S-ekvol, 4-etylfenol a O-desmetylangolensin (O-DMA). 4-etylfenol pravdepodobne primárne účinkuje ako inhibítor tromboxán syntázy, hlavný mechanizmus účinku equolu bol ale antagonizmus na tromboxánových receptoroch, nakoľko inhibícia COX-1 aj tromboxán syntázy u tejto látky bola iba mierna u oboch enzýmov, ale agregácia vyvolaná tromboxánovým analógom U-46619 bola ekvolom inhibovaná prakticky kompletne. V tejto práci sme teda úspešne identifikovali niekoľko metabolitov, ktoré by mohli byť zodpovedné za kardiovaskulárne benefity izoflavonoidov a čiastočne popísali ich mechanizmus účinku. Je ale treba spomenúť, že izoflavonoidy sa, na rozdiel od flavonoidov, vyznačujú vyššou biodostupnosťou a v ich prípade je možné, že parentné látky sa takisto podieľajú na biologických účinkoch stravy bohatej na izoflavonoidy, ako napr. sója [155, 156]. Táto práca nebola prvá, ktorá poukázala na antiagregačné účinky izoflavonoidných metabolitov, boli v nej ale prvýkrát zhodnotené účinky širokého spektra izoflavonoidov, ktoré sú prítomné v potrave a umožnila ich priame porovnanie za štandardizovaných podmienok. Je takisto potreba zdôrazniť, že sa v populácii vyskytuje iba 25-50 % jedincov, ktorí dokážu produkovať ekvol črevnou mikroflórou. Väčšina populácie neschopná produkovať ekvol konvertuje izoflavonoidy na O-DMA, ktorý nemá estrogénové účinky, v populácii sa teda môžu vyskytovať významné rozdiely v biologických účinkoch po príjme izoflavonoidov [157].

V prípade flavonoidov je, vzhľadom na ich výrazne nižšiu biodostupnosť takisto pravdepodobné, že sú za ich prospešné kardiovaskulárne účinky zodpovedné práve ich malé fenolické metabolity. Táto hypotéza bola čiastočne otestovaná už v minulosti: 1) Kim et al. spozoroval semikvantitatívne účinky fenolických metabolitov na agregáciu doštičiek [158] 2) u niektorých malých fenolických látok, ktoré sú súčasťou potravy a takisto môžu vznikať metabolizmom polyfenolov, bol detekovaný účinok na kolagénom indukovanú agregáciu, najúčinnšie látky patrili medzi hydroxybenzény [159] 3) fluoroglucinol inhiboval agregáciu doštičiek kráľika, takisto bolo zistené, že je účinný inhibítor COX-1 [160]. Chýbal však výskum ktorý by skúmal túto hypotézu podrobne. Preto bolo v publikácii Applová et al 2019 /publikácia č. 1 tejto dizertačnej práce/ za štandardizovaných podmienok otestovaných 29 komerčne dostupných látok, ktoré z flavonoidov môžu vzniknúť aktivitou črevnej mikroflóry. Táto práca predstavuje významný pokrok, nakoľko bolo identifikovaných viacero látok s výraznými antiagregačnými účinkami. Pri počiatočnom skríningu s využitím vysokých koncentrácií testovaných látok (240 μ M), ktorá jednoznačne nie je dosiahnuteľná iba príjmom stravy bohatej na polyfenoly, bola síce pozorovaná antiagregačná aktivita u viacerých látok, ani jedna látka

zo skupiny fenylacetových, fenylpropionových a benzoových kyselín avšak nedosahovala výraznú mieru inhibície. Boli ale úspešne identifikované 4 účinné malé fenolické látky. Zaujímavé bolo zistenie, že všetky účinné látky patrili do skupiny hydroxybenzénov a obsahovali aspoň 2 hydroxylové funkčné skupiny na benzénovom jadre. Ďalšie testovanie odhalilo, že pyrogalol a 4-MC sú jednoznačne najúčinnnejšími metabolitmi. Pyrogalol, ktorého antiagregačné účinky už boli popísané v minulosti, bol svojou účinnosťou podobný štandardu, ASA. Najvýznamnejším objavom boli antiagregačné účinky ďalšieho malého fenolického metabolitu, 4-metylkatecholu. U 4-MC bol síce popísaný efekt na metabolizmus AA u imunitných buniek [161], jeho antiagregačná aktivita bola ale veľmi prekvapivým zistením, nakoľko bol tento metabolit 10 krát účinnejší ako náš štandard, ASA. Účinnosť 4-MC aj pyrogalolu bola navyše potvrdená za použitia inovatívneho HET-CAV (hen's egg test on chick area vasculosa) modelu. Tento model umožňuje otestovať účinky látok na hemostázu v biologickom systéme bez využitia klasických zvieracích *in vivo* modelov. Využíva kuracie embryá v rannom štádiu vývoja, ktoré ale disponujú trombocytmi a primitívnym kardiovaskulárnym systémom. Po aplikácii induktora agregácie, v našom prípade AA, dôjde k výraznej hemostatickej reakcii ktorá spôsobí usmrtenie väčšiny embryí. V prípade inkubácie tohto systému s našimi antiagregačnými látkami, 4-MC a pyrogalolu, došlo k významnému predĺženiu prežitia kuracích embryí po aplikácii AA. Tento účinok bol numericky silnejší ako ochrana navodená ASA. Takisto bol v tejto štúdii skúmaný mechanizmus účinku 4-MC. Prvotné pokusy ukázali mierny inhibičný efekt na tromboxán syntázu a žiadny efekt na COX-1. 4-MC avšak inhiboval uvoľňovanie sérotonínu, ktorý je prítomný primárne v denzných granulách doštičiek a taktiež blokoval agregáciu vyvolanú kalcimycínom, ktorý spôsobuje zvýšenie koncentrácie intracelulárneho vápnika a tým vyvolá spustenie agregáčnej kaskády. Z týchto výsledkov vyplýva, že hlavný mechanizmus účinku 4-MC spočíva v interferovaní s intracelulárnym transportom vápnika.

Je zaujímavé, že 4-MC má aj viacero ďalších biologických účinkov. V minulosti sa výskum primárne zameriaval na jeho neuroprotektívne účinky, nakoľko 4-MC preukázateľne zvyšuje hladiny NGF a BDNF[129-131]. Podanie 4-MC u zvieracieho modelu zmiernilo rozsah poškodenia spôsobený podaným induktorom neurotoxicity a zlepšilo rekonvalescenciu. V prípade poškodenia periférnych nervov podanie 4-MC významne zlepšilo hojenie a reinerváciu kože aj svalstva, bez ohľadu na metódu použitia v štúdii (mechanické/chemické poškodenie nervov)[132-135]. Takisto bolo po podaní 4-MC pozorované zlepšenie kognitívnych schopností zvierat, zmiernenie depresívnych symptómov, prospešný vplyv bol pozorovaný aj u modelu chronickej bolesti[136-138]. Receptory pre NGF sú takisto významné pre fyziológiu pankreatických β -buniek, preto podanie 4-MC znížilo mieru ich apoptózy vyvolanú podaním streptozotocínu a aktivitu kaspázy 3, zvýšilo aktivitu antioxidantných enzýmov a zároveň znížilo viabilitu inzulínómu[139-141]. 4-MC by teda teoreticky mohol byť použitý pri terapii inzulínómu, ale aj pôsobiť protektívne u oboch foriem diabetu. Vplyv malých katecholických látok na

oxidačný stres bol takisto hodnotený za použitia viacerých bunkových modelov. Ukázalo sa, že 4-MC je jedným z aktivátorov NFR-2 bunkovej dráhy, ktorá je zapojená do obrany nielen proti oxidačnému stresu, ale aj rakovine a neurodegeneratívnym ochoreniam. Podanie 4-MC v koncentráciách desiatok μM teda u buniek spôsobilo aktiváciu NFR-2, zvýšenú expresiu jedného z „downstream“ cieľov tejto dráhy, hém oxygenázy-1, a tým viedlo k zníženiu oxidačného stresu a zníženiu apoptózy vyvolanej aplikáciou H_2O_2 . Zaujímavé bolo aj zistenie, že podanie 4-MC u melanómvej bunkovej línie spôsobilo indukciu apoptózy, ale neovplyvnilo rast normálnych epidermálnych buniek. Toto zistenie by sa dalo vysvetliť vyššou metabolickou aktivitou rakovinových bunkových línií, ktorá môže vyvolať redoxné cyklenie 4-MC a tým viesť k poškodzovaniu buniek a apoptóze[142-144]. Kardiovaskulárne účinky 4-MC okrem našej skupiny skúmala aj skupina Oudot et al. V *in vivo* modeli hypertenzívnych potkanov pôsobil 4-MC ako kardioprotektívum a zmiernoval hypertrofiu srdca typickú pre tento model. Takisto zlepšoval prežitie zvierat, znižoval krvný tlak a normalizoval hmotnosť zvierat so zvýšeným príjmom soli. Ako mechanizmus tohto účinku bola definovaná zvýšená expresia cystein and glycin-rich protein 3 (CSRP -3), proteínu spájaného s kardioprotektívnymi účinkami[111].

Moji kolegovia zo skupiny Kardiovaskulárni farmakologie a toxikologie ukázali, že 4-MC má výrazné vazodilatačné účinky, ktoré boli pozorované *in vitro* aj *in vivo* [145, 162], a jeho *in vivo* antihypertenzívne účinky sa taktiež môžu potencovať s účinkami iných metabolitov, čo bolo preukázané u 3-hydroxyfenylpropiónovej kyseliny [147].

4-MC je teda látka so širokým spektrom biologických účinkov, ktoré by mohli vysvetľovať prospešné účinky stravy bohatej na polyfenoly u metabolických ochorení ako ateroskleróza, DM 2 a s nimi spojených komplikácií.

Aby sme boli schopní presnejšie definovať, akým spôsobom 4-MC u doštičiek interferuje s intracelulárnym vápnikom bolo nutné rozšíriť metodiky, ktorými je vyhodnocovaný mechanizmus účinku antiagregačných látok. V našej publikácii Hrubša et al. /publikácia č. 4 tejto dizertačnej práce/ boli vyhodnotené antiagregačné a vazodilatačné účinky derivátov 3,3-dimethyl-6-oxopyrano[3,4-c]pyridínu a takisto boli rozšírené metodiky testovania mechanizmu účinku a toxicity skúmaných látok. Tieto metodiky zamerané na transport vápnika a proteínkinázu C nám umožnili podrobnejšie skúmať účinky 4-MC a jeho derivátov, na ktoré som sa zameril v nasledujúcich publikáciách.

Mechanizmus účinku 4-MC a overenie jeho účinnosti na rozsiahlejšej populácii boli témou publikácie Hrubša et al. 2022 /publikácia č. 6 tejto dizertačnej práce/. Táto publikácia priamo nadväzuje na našu predchádzajúcu prácu Applová et al. 2019. Využitím väčšej populačnej vzorky (53 darcov) v širšom vekovom rozpätí sme dokázali potvrdiť efekt 4-MC a ukázalo sa, že 4-MC je aj v nižších dávkach efektívnym antiagregačným liečivom. Opäť sa preukázal vyšší účinok tohto metabolitu v porovnaní s ASA. V tejto štúdii som pokračoval v skúmaní mechanizmu účinku 4-MC a nadviazal na výsledky našej

predchádzajúcej publikácie. Vzhľadom k tomu, že 4-MC nemá významný efekt na COX-1 ani tromboxán syntázu a takisto neblokuje agregáciu indukovanú trombínom (receptory spojené G_q ale aj $G_{12/13}$) a ADP (viacero receptorov, *mi. Gi*) som sa zameral na ďalšie receptory a dráhy, ktoré by sa mohli na jej účinku podieľať.

Jednou zo skúmaných dráh je PAF receptor spojený s G_q proteínom, a teda s aktiváciou proteínkinázy C (PKC). 4-MC bol schopný dávkovo závislej inhibície agregácie vyvolanej týmto agonistom. Vzhľadom na relatívne miernu inhibíciu je ale veľmi nepravdepodobný priamy antagonizmus na PAF-1 receptore.

Účinok na PKC, ktorá je spoločným „downstream“ cieľom viacerých aktivačných dráh, sme ďalej skúmali s použitím bryostatínu, priameho aktivátora/modulátora PKC. 4-MC bol schopný čiastočne inhibovať aktiváciu PKC, priamy účinok 4-MC na PKC sa teda môže podieľať na jeho antiagregačnom účinku.

Vzhľadom na to, že vplyv 4-MC na intracelulárne hladiny Ca^{2+} bol pozorovaný už s použitím kalcimycínu [146] sme sa rozhodli zhodnotiť jeho efekt na vyplavenie Ca^{2+} zo sarkoplazmatického retikula, ktoré predstavuje hlavnú zásobáreň Ca^{2+} pri aktivácii doštičiek. S použitím thapsigargínu, ktorý priamo inhibuje spätný transport vápnika do sarkoplazmatického retikula dokážeme vyvolať zvýšenie hladiny vápnika a spustenie agregácie [163-165]. 4-MC bol schopný čiastočne blokovať aj túto cestu aktivácie, jeho mechanizmus účinku je teda spojený s transportom Ca^{2+} .

4-MC jednoznačne inhibuje AA indukovanú agregáciu, preto som takisto skúmal ďalšie kroky AA kaskády. Uvoľňovanie AA prebieha intracelulárne prostredníctvom fosfolipáz, preto sme použili pyrofenón, inhibitor fosfolipázy A_2 . 4-MC vo vyšších koncentráciách pôsobil aditívne k účinku pyrofenónu, je teda pravdepodobné, že nepôsobí ako priamy inhibitor PLA_2 .

Vzhľadom na to, že priamy antagonizmus na tromboxánových receptoroch nie je pravdepodobne hlavným mechanizmom účinku, zisťovali sme, či nie je 4-MC schopný kvantitatívne ovplyvniť produkciu TXA_2 po pridaní AA, substrátu COX-1. Ukázalo sa, že 4-MC je schopný znížiť celkové množstvo produkovaného tromboxánu A_2 aj napriek tomu, že nie je inhibítorom ani jedného z enzýmov, ktoré sú súčasťou tejto kaskády. Pri súčasnom použití 4-MC a ASA sme pozorovali aditívny efekt, je teda veľmi pravdepodobné, že 4-MC narušuje koordináciu týchto enzýmov alebo transport prostaglandínových intermediátov medzi COX a TXS.

Efekt vWF, ktorý je spolu s kolagénom najfyziologickejšími induktormi agregácie, je možné *in vitro* simulovať s použitím ristocetínu, a tým skúmať efekt látok na GP Ib-V-XI receptorový komplex. 4-MC inhiboval ristocetínom indukovanú agregáciu mierne, respektíve najmä až vo vyšších koncentráciách, čo súvisí pravdepodobne s inhibíciou vyššie popísaných kaskád. Mierna inhibícia je asi dôsledkom toho, že táto kaskáda je komplexná a nezahŕňa iba metabolizmus AA.

Finálnym krokom agregáčnej kaskády je aktivácia glykoproteínu $\alpha_{IIb}\beta_{IIIa}$. Tento receptor je bohatý na thiolové skupiny a cysteínové mostíky. Použitím redukčného činidla dithiotreitolu sme dokázali receptor previesť do vysokoafinitného stavu a navodiť agregáciu doštičiek. 4-MC čiastočne inhiboval aj túto aktiváciu. S ohľadom na to, že dithiotreitol nie je plnohodnotný induktor (nespôsobuje zmenu tvaru a vyplavenie granúl) a inhibícia nebola kompletná, toto zistenie potvrdilo, že 4-MC pôsobí v inom kroku agregáčnej kaskády, čo súhlasí s našou hypotézou interferencie s hladinami Ca^{2+} .

V tejto štúdii boli zahrnutí iba darcovia bez ochorení, ktoré by výrazne ovplyvňovali funkciu doštičiek, preto v súčasnosti prebieha nadväzujúca štúdia skúmajúca efekt 4-MC u pacientov s metabolickými ochoreniami alebo u polymorbídnych geriatrických pacientov.

4-MC teda predstavuje efektívnu antiagregačnú látku, ktorá by teoreticky mohla nájsť uplatnenie v terapii alebo slúžiť ako templát pre vývoj nových antiagregačných liečiv. Preto sme sa zamerali na preskúmanie vzťahu štruktúry a účinku v publikácii Hrubša et al. 2022 /publikácia č. 5 tejto dizertačnej práce/. V tejto štúdii bolo otestovaných 22 komerčne dostupných látok vybraných na základe štruktúrnej podobnosti s 4-MC. Okrem ich antiagregačnej aktivity bola takisto vyhodnotená ich cytotoxicita s využitím *in vitro* metodík. Testy bunkovej viability ukázali, že najúčinnšie látky neovplyvňovali rast buniek, mali by teda byť vhodné pre prípadné nadväzujúce *in vivo* štúdie. Táto publikácia nám poskytla niekoľko podstatných informácií o vzťahu medzi štruktúrou a antiagregačnými účinkami katecholov. Prvým významným zistením je, že látky bez hydroxylovej skupiny prítomnej na benzénovom jadre nemali takmer žiadnu antiagregačnú aktivitu. Prítomnosť jednej hydroxylovej skupiny významne zvýšila aktivitu, najúčinnšie boli ale látky charakteru katecholov, teda obsahujúce ortho-dihydroxy substitúciu. Jedna z týchto hydroxylových skupín môže ale byť nahradená metoxylom bez straty aktivity (4-metylguajakol), či dokonca miernym zvýšením antiagregačného efektu (4-etylguajakol). Substitúcia základnej katecholovej štruktúry vedie k zvýšeniu aktivity v prípade menších, nerozvetvených substituentov, ako bolo pozorované u 4-MC, 4-etylkatecholu alebo fluorokatecholov. Prítomnosť väčších a rozvetvených alkylov aktivitu naopak znižovala (4-*terc*-butylkatechol). Disubstitúcia atómami chlóru viedla k zníženiu aktivity, najmä v prípade 3,5-dichlórokatecholu. V prípade monosubstitúcie fluórom bola aktivita zvýšená v oboch prípadoch, u 4-chlórokatecholu nedošlo k výraznej zmene aktivity. Zavedenie funkčných skupín obsahujúcich atóm dusíka viedla k zníženiu aktivity, tento negatívny efekt bol najmiernejší u 3-aminokatecholu.

Môžeme teda na záver zhrnúť, že v tejto práci sa podarilo identifikovať niekoľko malých fenolických metabolitov polyfenolických látok a čiastočne definovať ich mechanizmus účinku. Takisto bol u najúčinnnejšej látky, 4-metylkatecholu, potvrdený jeho efekt na heterogénnej populačnej vzorke. Nadväzujúca štúdia, ktorá momentálne prebieha, skúma vplyv 4-MC na agregáciu u pacientov s DM 2 a má za účel doplniť naše poznatky a potvrdiť viabilitu tejto látky ako potenciálneho liečiva. Vzhľadom na nízku toxicitu a fakt, že jeho metabolit, sulfát, dosahuje významných plazmatických koncentrácií pri

konzumácii stravy bohatej na polyfenoly je pravdepodobné, že biodostupnosť tejto molekuly je dostatočná pre jej perorálne podanie. V každom prípade by tieto výsledky mali byť doplnené o *in vivo* štúdie skúmajúce absorpciu 4-MC a jeho efekt na relevantných zvieracích modeloch.

Ďalšiemu pre/klinickému testovaniu tejto látky momentálne bráni overenie biodostupnosti čistej látky po perorálnom podaní, ktoré ešte nebolo vykonané. Ak by tieto štúdie potvrdili jeho dostatočnú biodostupnosť, je veľmi pravdepodobné, že by sa potvrdili aj jeho farmakodynamické účinky u ľudí, nakoľko bola v plnej ľudskej krvi podľa našich *ex vivo* experimentov dosiahnutá významná inhibícia agregácie doštičiek. V prípade, že by jeho biodostupnosť bola nedostatočná, je možné uvažovať o jeho proliečivách alebo využití našich nových výsledkov a zameraní sa na niektorý z jeho štruktúrnych analógov s podobne silným účinkom a preverení jeho biodostupnosti. Prípadne je tu aj možnosť sa zamerať na ďalšie štruktúrne obmeny, na ktorých naša skupina v spolupráci s ďalšími pracoviskami takisto pracuje.

11. Podiel kandidáta na publikáciách

4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects

-spoluúčasť na antiagregačných experimentoch a mikroskopii

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

-spoluúčasť na antiagregačných experimentoch a analýze dát

The Effect of Silymarin Flavonolignans and Their Sulfated Conjugates on Platelet Aggregation and Blood Vessels Ex Vivo

-spoluúčasť na antiagregačných experimentoch a analýze dát

Synthesis of 3,3-dimethyl-6-oxopyrano[3,4-c]pyridines and their antiplatelet and vasodilatory activity

- vykonanie väčšiny antiagregačných experimentov a analýza získaných dát

- príprava a revízia manuskriptu

Comparison of Antiplatelet Effects of Phenol Derivatives in Humans

- vykonanie väčšiny antiagregačných experimentov a analýza získaných dát

-príprava a revízia manuskriptu

The Antiplatelet Effect of 4-Methylcatechol in a Real Population Sample and Determination of the Mechanism of Action

- vykonanie väčšiny antiagregačných experimentov a analýza získaných dát

- príprava a revízia manuskriptu

12. Prehľad publikovaných prác

1. Migkos, T., L. Applová, P. Horký, V. Tvrдый, J. Karlíčková, K. Macáková, M. Hrubša, M. C. Catapano, M. Tomanek, M. Pour and P. Mladěnka (2019). "The influence of microbial isoflavonoid specific metabolites on platelets and transition metals iron and copper." *Phytomedicine* 62: 152974.
IF₂₀₁₉ = 4, 268; IF-Q: D1, D1, Q1, Q1; AIS-Q: D1, Q1, Q2, Q2; wQ2
2. Applová, L., J. Karlíčková, P. Warncke, K. Macáková, M. Hrubša, M. Macháček, V. Tvrдый, D. Fischer and P. Mladěnka (2019). "4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects." *Molecular Nutrition & Food Research* 63(20): 1900261.
IF₂₀₁₉ = 5, 309; IF-Q: Q1; AIS-Q: D1; wD1
3. Pourová, J., L. Applová, K. Macáková, M. Vopršalová, T. Migkos, R. Bentanachs, D. Biedermann, L. Petrásková, V. Tvrдый, M. Hrubša, J. Karlíčková, V. Křen, K. Valentová and P. Mladěnka (2019). "The Effect of Silymarin Flavonolignans and Their Sulfated Conjugates on Platelet Aggregation and Blood Vessels Ex Vivo." *Nutrients* 11(10): 2286.
IF₂₀₁₉ = 4, 546; IF-Q: Q1; AIS-Q: Q2; wQ2
4. Mladěnka, P., J. Karlíčková, M. Hrubša, E. Veljović, S. Muratović, A. Carazo, A. Shivling Mali, S. Špirtović-Halilović, L. Saso, M. Pour and K. Durić (2020). "Interaction of 2,6,7-Trihydroxy-Xanthene-3-Ones with Iron and Copper, and Biological Effect of the Most Active Derivative on Breast Cancer Cells and Erythrocytes." *Applied Sciences* 10(14): 4846.
IF₂₀₂₀ = 2, 679; IF-Q: Q2, Q2, Q3, Q3; AIS-Q: Q3, Q3, Q3, Q3; wQ3
5. Lomozová, Z., V. Tvrдый, M. Hrubša, M. C. Catapano, K. Macáková, D. Biedermann, R. Kučera, V. Křen, P. Mladěnka and K. Valentová (2021). "Dehydroflavonolignans from Silymarin Potentiate Transition Metal Toxicity In Vitro but Are Protective for Isolated Erythrocytes Ex Vivo." *Antioxidants* 10(5): 679.
IF₂₀₂₁ = 7, 675; IF-Q: D1, D1, Q1; AIS-Q: Q1, Q1, Q2; wQ2
6. Sirakanyan, S. N., M. Hrubša, D. Spinelli, P. Dias, V. Kartsev, A. Carazo, A. A. Hovakimyan, J. Pourová, E. K. Hakobyan, J. Karlíčková, S. Parvin, J. Fadraersada, K. Macáková, A. Geronikaki and P. Mladěnka (2021). "Synthesis of 3,3-dimethyl-6-oxopyrano[3,4-c]pyridines and their antiplatelet and vasodilatory activity." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 74(6): 887-895.
IF₂₀₂₁ = 4, 810; IF-Q: Q2; AIS-Q: Q3; wQ3
7. Lomozová, Z., M. C. Catapano, M. Hrubša, J. Karlíčková, K. Macáková, R. Kučera and P. Mladěnka (2021). "Chelation of Iron and Copper by Quercetin B-Ring Methyl Metabolites, Isorhamnetin and Tamarixetin, and Their Effect on Metal-Based Fenton Chemistry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69(21): 5926-5937.
IF₂₀₂₁ = 5, 895, IF-Q: Q1, Q1, Q1; AIS-Q: Q1, Q1, Q1; wQ1
8. Tvrдый, V., M. Hrubša, E. Jirkovský, D. Biedermann, M. Kutý, K. Valentová, V. Křen and P. Mladěnka (2021). "Silymarin Dehydroflavonolignans Chelate Zinc and Partially Inhibit Alcohol Dehydrogenase." *Nutrients* 13(12): 4238.
IF₂₀₂₁ = 6, 706; IF-Q: Q1; AIS-Q: Q2; wQ2

9. Hrubša, M., K. Nurjamal, A. Carazo, N. Nayek, J. Karličková, L. Applová, I. Karmakar, S. Parvin, J. Fadraersada, K. Macáková, P. Mladěnka and G. Brahmachari (2022). "Screening of Synthetic Heterocyclic Compounds as Antiplatelet Drugs." *Medicinal Chemistry* 18(5): 536-543.
- IF₂₀₂₁ = 2, 329; IF-Q: Q4; AIS-Q: Q4; wQ4
10. Hrubša, M., R. Alva, M. S. Parvin, K. Macáková, J. Karličková, J. Fadraersada, L. Konečný, M. Moravcová, A. Carazo and P. Mladěnka (2022). "Comparison of Antiplatelet Effects of Phenol Derivatives in Humans." *Biomolecules* 12(1): 117.
- IF₂₀₂₁ = 6, 064; IF-Q: Q2; AIS-Q: Q2; wQ2
11. Hrubša, M., T. Siatka, I. Nejmanová, M. Vopršalová, L. Kujovská Krčmová, K. Matoušová, L. Javorská, K. Macáková, L. Mercolini, F. Remião, M. Máťuš, P. Mladěnka and o. b. o. t. OEMONOM (2022). "Biological Properties of Vitamins of the B-Complex, Part 1: Vitamins B1, B2, B3, and B5." *Nutrients* 14(3): 484.
- IF₂₀₂₁ = 6, 706; IF-Q: Q1; AIS-Q: Q2; wQ2
12. Hrubša, M., V. Tvrđý, M. Kutý, K. Valentová, V. Křen and P. Mladěnka (2022). "Interaction of Flavonoids with Zinc and Zinc-Containing Enzymes." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 70(20): 6134-6144.
- IF₂₀₂₁ = 5, 895, IF-Q: Q1, Q1, Q1; AIS-Q: Q1, Q1, Q1; wQ1
13. Lomozová, Z., M. Hrubša, P. F. Conte, E. Papastefanaki, M. Moravcová, M. C. Catapano, I. Proietti Silvestri, J. Karličková, R. Kučera, K. Macáková and P. Mladěnka (2022). "The effect of flavonoids on the reduction of cupric ions, the copper-driven Fenton reaction and copper-triggered haemolysis." *Food Chemistry* 394: 133461.
- IF₂₀₂₁ = 9, 231; IF-Q: D1, D1, D1; AIS-Q: D1, Q1, Q2; wQ1
14. P Parvin, M. S., M. Hrubša, J. Fadraersada, A. Carazo, J. Karličková, L. Cahlíková, J. Chlebek, K. Macáková and P. Mladěnka (2022). "Can Isoquinoline Alkaloids Affect Platelet Aggregation in Whole Human Blood?" *Toxins* 14(7): 491.
- IF₂₀₂₁ = 5, 075; IF-Q: Q1, Q2; AIS-Q: Q1, Q1; wQ1
15. Carazo, A., M. Hrubša, L. Konečný, P. Skořepa, M. Paclíková, F. Musil, J. Karličková, L. Javorská, K. Matoušová, L. K. Krčmová, M. S. Parvin, A. Šmahelová, V. Blaha and P. Mladěnka (2022). "Sex-Related Differences in Platelet Aggregation: A Literature Review Supplemented with Local Data from a Group of Generally Healthy Individuals." *Semin Thromb Hemost.*, *in press*
- IF₂₀₂₁ = 6, 415; IF-Q: Q1, Q2 ;AIS-Q: Q2, Q2; wQ2
16. Moravcová, M., M. Hrubša, Z. Lomozová, M. C. Catapano, R. Argento, E. Jirkovský, R. Kučera, L. Mercolini and P. Mladěnka (2022). "A complex methodological approach for the screening of efficient and safe cobalt chelators." *Medicinal Chemistry*, *in press*
- IF₂₀₂₁ = 2, 329; IF-Q: Q4; AIS-Q: Q4; wQ4
17. Hrubša, M., L. Konečný, M. Paclíková, M. S. Parvin, P. Skořepa, F. Musil, J. Karličková, L. Javorská, K. Matoušová, L. K. Krčmová, A. Carazo, A. Šmahelová, V. Blaha and P. Mladěnka (2022). "The Antiplatelet Effect of 4-Methylcatechol in a Real Population Sample and Determination of the Mechanism of Action." *Nutrients* 14(22): 4798.
- IF₂₀₂₁ = 6, 706; IF-Q: Q1; AIS-Q: Q2; wQ2

13. Prezentovanie výsledkov na konferenciách

23. - 24. 1. 2019

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

Effect of 4-methylcatechol on the release of serotonin and thromboxane in human platelets –
ústna prezentácia

17.- 21. 9. 2019

3rd Annual International Conference Bio – Antioxidants, Nessebar, Bulharsko

Novel flavonoids and isoflavonoids as antiplatelet drugs – poster

22. - 23. 1. 2020

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

Platelet aggregation in healthy population: Preliminary data on age-dependent differences -
ústna prezentácia

27. – 28. 1. 2021

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

Antiplatelet activity of 3,3-dimethyl-6-oxopyrano[3,4-c] pyridines - ústna prezentácia

15. -17. 9. 2021

26th Interdisciplinary Toxicology Conference, Stará Lesná, Slovenská Republika

Effect of flavonoids on copper-triggered haemolysis - ústna prezentácia

9.-13. 7. 2022

Internation Society for Thrombosis and Haemostasis 2022 Congress in London, Veľká Británia

Comparison of antiplatelet effects of small phenolic compounds - poster

14. Zoznam použitej literatúry

1. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat. Med., 2011. **17**(11): p. 1410-1422.
2. Libby, P., *The changing landscape of atherosclerosis*. Nature, 2021. **592**(7855): p. 524-533.
3. Libby, P., et al., *Atherosclerosis*. Nat. Rev. Dis. Primers, 2019. **5**(1): p. 56.
4. Ference, B.A., et al., *Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel*. Eur. Heart J., 2017. **38**(32): p. 2459-2472.
5. Siddiqi, H.K., D. Kiss, and D. Rader, *HDL-cholesterol and cardiovascular disease: rethinking our approach*. Curr. Opin. Cardiol., 2015. **30**(5): p. 536-542.
6. Nording, H., L. Baron, and H.F. Langer, *Platelets as therapeutic targets to prevent atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2020. **307**: p. 97-108.
7. King, H., R.E. Aubert, and W.H. Herman, *Global Burden of Diabetes, 1995–2025: Prevalence, numerical estimates, and projections*. Diabetes Care, 1998. **21**(9): p. 1414-1431.
8. Lüscher, T.F., et al., *Diabetes and Vascular Disease*. Circulation, 2003. **108**(13): p. 1655-1661.
9. Kannel, W.B., et al., *Diabetes, fibrinogen, and risk of cardiovascular disease: the Framingham experience*. Am. Heart J., 1990. **120**(3): p. 672-6.
10. Laakso, M. and S. Lehto, *Epidemiology of risk factors for cardiovascular disease in diabetes and impaired glucose tolerance*. Atherosclerosis, 1998. **137** Suppl. 1: p. S65-73.
11. Haffner, S.M., et al., *Mortality from Coronary Heart Disease in Subjects with Type 2 Diabetes and in Nondiabetic Subjects with and without Prior Myocardial Infarction*. NEJM, 1998. **339**(4): p. 229-234.
12. Ferreiro, J.L., J.A. Gómez-Hospital, and D.J. Angiolillo, *Platelet abnormalities in diabetes mellitus*. Diab. Vasc. Dis. Res., 2010. **7**(4): p. 251-9.
13. Kaur, R., M. Kaur, and J. Singh, *Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies*. Cardiovasc. Diabetol., 2018. **17**(1): p. 121.
14. Gaiz, A., et al., *Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes; Role of platelet hyperactivity*. Biomed. Pharmacother., 2017. **94**: p. 679-686.
15. Eibl, N., et al., *Improved metabolic control decreases platelet activation markers in patients with type-2 diabetes*. Eur. J. Clin. Invest., 2004. **34**(3): p. 205-9.
16. Yngen, M., et al., *Effects of improved metabolic control on platelet reactivity in patients with type 2 diabetes mellitus following coronary angioplasty*. Diab. Vasc. Dis. Res., 2006. **3**(1): p. 52-6.
17. Malmberg, K., *Prospective randomised study of intensive insulin treatment on long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. DIGAMI (Diabetes Mellitus, Insulin Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) Study Group*. BMJ, 1997. **314**(7093): p. 1512-5.
18. Malmberg, K., et al., *Intense metabolic control by means of insulin in patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction (DIGAMI 2): effects on mortality and morbidity*. Eur. Heart J., 2005. **26**(7): p. 650-61.
19. Gerstein, H.C., et al., *Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes*. NEJM, 2008. **358**(24): p. 2545-59.
20. Finfer, S., et al., *Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients*. NEJM, 2009. **360**(13): p. 1283-97.
21. Randriamboavonjy, V., et al., *Platelet sarcoplasmic endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and mu-calpain activity are altered in type 2 diabetes mellitus and restored by rosiglitazone*. Circulation, 2008. **117**(1): p. 52-60.
22. Sidhu, J.S., et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reduces circulating platelet activity in patients without diabetes mellitus who have coronary artery disease*. Am. Heart J., 2004. **147**(6): p. e25.

23. Nissen, S.E., et al., *Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial*. JAMA, 2008. **299**(13): p. 1561-73.
24. McGuire, D.K., et al., *Association of diabetes mellitus and glycemic control strategies with clinical outcomes after acute coronary syndromes*. Am. Heart J., 2004. **147**(2): p. 246-52.
25. Gerstein, H.C., et al., *Effect of rosiglitazone on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease: the assessment on the prevention of progression by rosiglitazone on atherosclerosis in diabetes patients with cardiovascular history trial*. Circulation, 2010. **121**(10): p. 1176-87.
26. Loke, Y.K., C.S. Kwok, and S. Singh, *Comparative cardiovascular effects of thiazolidinediones: systematic review and meta-analysis of observational studies*. BMJ, 2011. **342**: p. d1309.
27. Nesti, L., et al., *Rethinking pioglitazone as a cardioprotective agent: a new perspective on an overlooked drug*. Cardiovasc. Diabetol., 2021. **20**(1): p. 109.
28. Muscari, A., et al., *Determinants of mean platelet volume (MPV) in an elderly population: relevance of body fat, blood glucose and ischaemic electrocardiographic changes*. Thromb. Haemost., 2008. **99**(6): p. 1079-84.
29. Sugiyama, C., et al., *Platelet aggregation in obese and diabetic subjects: association with leptin level*. Platelets, 2007. **18**(2): p. 128-34.
30. Scherrer, U., et al., *Effect of weight reduction in moderately overweight patients on recorded ambulatory blood pressure and free cytosolic platelet calcium*. Circulation, 1991. **83**(2): p. 552-8.
31. Anfossi, G., I. Russo, and M. Trovati, *Platelet dysfunction in central obesity*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., 2009. **19**(6): p. 440-449.
32. Guthikonda, S., et al., *Role of Reticulated Platelets and Platelet Size Heterogeneity on Platelet Activity After Dual Antiplatelet Therapy With Aspirin and Clopidogrel in Patients With Stable Coronary Artery Disease*. J. Am. Coll. Cardiol., 2008. **52**(9): p. 743-749.
33. Mills, K.T., A. Stefanescu, and J. He, *The global epidemiology of hypertension*. Nat. Rev. Nephrol., 2020. **16**(4): p. 223-237.
34. El Haouari, M. and J.A. Rosado, *Platelet function in hypertension*. Blood Cells Mol. Dis., 2009. **42**(1): p. 38-43.
35. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J. Cell. Biol., 2013. **201**(6): p. 785-96.
36. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *2 - Megakaryocyte Development and Platelet Formation, in Platelets (Fourth Edition)*. 2019, Academic Press. p. 25-46.
37. Schwer, H.D., et al., *A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets*. Curr. Biol., 2001. **11**(8): p. 579-86.
38. Thon, J.N., et al., *Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release*. J. Cell. Biol., 2010. **191**(4): p. 861-74.
39. Patel, S.R., J.H. Hartwig, and J.E. Italiano, Jr., *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. J. Clin. Invest., 2005. **115**(12): p. 3348-54.
40. Gurney, A.L., et al., *Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice*. Science, 1994. **265**(5177): p. 1445-7.
41. Gainsford, T., et al., *Cytokine production and function in c-mpl-deficient mice: no physiologic role for interleukin-3 in residual megakaryocyte and platelet production*. Blood, 1998. **91**(8): p. 2745-52.
42. Choi, E.S., et al., *Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional*. Blood, 1995. **85**(2): p. 402-13.
43. Ito, T., et al., *Recombinant human c-Mpl ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation in mature human megakaryocytes*. Br. J. Haematol., 1996. **94**(2): p. 387-90.
44. Kühne, T. and P. Imbach, *Eltrombopag: an update on the novel, non-peptide thrombopoietin receptor agonist for the treatment of immune thrombocytopenia*. Ann. Hematol., 2010. **89**(1): p. 67-74.

45. Harker, L.A., *The kinetics of platelet production and destruction in man*. Clin. Haematol., 1977. **6**(3): p. 671-93.
46. Jinna, S. and P.B. Khandhar, *Thrombocytopenia*, in *StatPearls*. 2022: Treasure Island (FL).
47. Gremmel, T., A.L. Frelinger, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Semin. Thromb. Hemost., 2016. **42**(03): p. 191-204.
48. Zwaal, R.F.A., P. Comfurius, and L.L.M. Van Deenen, *Membrane asymmetry and blood coagulation*. Nature, 1977. **268**(5618): p. 358-360.
49. Thomas, S.G., *3 - The Structure of Resting and Activated Platelets*, in *Platelets (Fourth Edition)*. 2019, Academic Press. p. 47-77.
50. Shin, H.-W. and H. Takatsu, *Phosphatidylserine exposure in living cells*. Crit. Rev. Biochem. Mol., 2020. **55**(2): p. 166-178.
51. Tang, X., et al., *A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity*. Science, 1996. **272**(5267): p. 1495-7.
52. Paulusma, C.C. and R.P.J. Oude Elferink, *P4 ATPases – The physiological relevance of lipid flipping transporters*. FEBS Letters, 2010. **584**(13): p. 2708-2716.
53. Dekkers, D.W., et al., *Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1)*. Biochemistry, 1998. **37**(42): p. 14833-7.
54. Ravi, S., et al., *Metabolic plasticity in resting and thrombin activated platelets*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123597.
55. Bearer, E.L., J.M. Prakash, and Z. Li, *Actin dynamics in platelets*. Int. Rev. Cytol., 2002. **217**: p. 137-182.
56. White, J.G., *Platelets are coverocytes, not phagocytes: Uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system*. Platelets, 2005. **16**(2): p. 121-131.
57. Melchinger, H., et al., *Role of Platelet Mitochondria: Life in a Nucleus-Free Zone*. Front. Cardiovasc. Med., 2019. **6**: p. 153.
58. Czapek, E.E., D. Deykin, and E.W. Salzman, *Platelet Dysfunction in Glycogen Storage Disease Type I*. Blood, 1973. **41**(2): p. 235-247.
59. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. Blood. Rev., 2009. **23**(4): p. 177-89.
60. Davì, G., F. Santilli, and N. Vazzana, *Thromboxane Receptors Antagonists and/or Synthase Inhibitors*, in *Antiplatelet Agents*. 2012, Springer Berlin Heidelberg. p. 261-286.
61. Voynow, J.A. and A. Kummarapurugu, *Isoprostanes and asthma*. Biochim. Biophys. Acta, 2011. **1810**(11): p. 1091-1095.
62. Capra, V., et al., *Impact of vascular thromboxane prostanoid receptor activation on hemostasis, thrombosis, oxidative stress, and inflammation*. J. Thromb. Haemost., 2014. **12**(2): p. 126-137.
63. Murakami, M. and I. Kudo, *Phospholipase A2*. J. Biochem., 2002. **131**(3): p. 285-92.
64. Carey, F., S. Menashi, and N. Crawford, *Localization of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase in human platelet intracellular membranes*. Biochem. J., 1982. **204**(3): p. 847-51.
65. Fischer, S. and P.C. Weber, *Thromboxane A3 (TXA3) is formed in human platelets after dietary eicosapentaenoic acid (C20:5 omega 3)*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1983. **116**(3): p. 1091-9.
66. Krämer, H.J., et al., *Fish oil fatty acids and human platelets: dose-dependent decrease in dienoic and increase in trienoic thromboxane generation*. Biochem. Pharmacol., 1996. **52**(8): p. 1211-7.
67. Lopez, L.R., et al., *Platelet thromboxane (11-dehydro-Thromboxane B2) and aspirin response in patients with diabetes and coronary artery disease*. World J. Diabetes, 2014. **5**(2): p. 115-27.
68. Surin, W.R., M.K. Barthwal, and M. Dikshit, *Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: Emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis*. Thromb. Res., 2008. **122**(6): p. 786-803.

69. Li, R., *10 - The Glycoprotein Ib-IX-V Complex*, in *Platelets (Fourth Edition)*. 2019, Academic Press. p. 193-211.
70. Estevez, B. and X. Du, *New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling*. Physiology (Bethesda), 2017. **32**(2): p. 162-177.
71. USFDA. *Approval Package for: Zontivity Tablets*. 2014 [13.10.2022]; Available from: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2014/204886Orig1s000Approv.pdf.
72. Prescott, S.M., et al., *Platelet-activating factor and related lipid mediators*. Annu. Rev. Biochem., 2000. **69**: p. 419-45.
73. Travers, J.B., J.G. Rohan, and R.P. Sahu, *New Insights Into the Pathologic Roles of the Platelet-Activating Factor System*. Front. Endocrinol. (Lausanne), 2021. **12**: p. 624132.
74. Ashraf, M.A. and V. Nookala, *Biochemistry of Platelet Activating Factor*, in *StatPearls*. 2022, StatPearls Publishing.
75. Flaumenhaft, R. and A. Sharda, *19 - Platelet Secretion*, in *Platelets (Fourth Edition)*. 2019, Academic Press. p. 349-370.
76. Gąsecka, A., et al., *Role of P2Y Receptors in Platelet Extracellular Vesicle Release*. Int. J. Mol. Sci., 2020. **21**(17).
77. Bledzka, K., J. Qin, and E.F. Plow, *12 - Integrin α IIb β 3*, in *Platelets (Fourth Edition)*. 2019, Academic Press. p. 227-241.
78. Dwivedi, R. and V. Pomin, *Marine Antithrombotics*. Mar. Drugs, 2020. **18**: p. 514.
79. Yi, X., et al., *Aspirin resistance in Chinese stroke patients increased the rate of recurrent stroke and other vascular events*. Int. J. Stroke., 2013. **8**(7): p. 535-9.
80. Davi, G., et al., *In Vivo Formation of 8-Epi-Prostaglandin F₂ Is Increased in Hypercholesterolemia*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1997. **17**(11): p. 3230-3235.
81. Cox, D., et al., *Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers*. Stroke, 2006. **37**(8): p. 2153-8.
82. Würtz, M., et al., *The antiplatelet effect of aspirin is reduced by proton pump inhibitors in patients with coronary artery disease*. Heart, 2010. **96**(5): p. 368-71.
83. SÚKL. *Souhrn údajů o přípravku: Anopyrin 100 mg tablety*. 2020 [cited 2022 10.11.2022]; Available from: <https://www.sukl.cz/modules/medication/download.php?file=SPC154278.pdf&type=spc&as=anopyrin-spc>.
84. Gremmel, T., et al., *Novel aspects of antiplatelet therapy in cardiovascular disease*. Res. Pract. Thromb. Haemost., 2018. **2**(3): p. 439-449.
85. Berger, J.S., *Oral Antiplatelet Therapy for Secondary Prevention of Acute Coronary Syndrome*. Am. J. Cardiovasc. Drugs, 2018. **18**(6): p. 457-472.
86. Wallentin, L., et al., *Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. NEJM, 2009. **361**(11): p. 1045-57.
87. Levine, G.N., et al., *2016 ACC/AHA Guideline Focused Update on Duration of Dual Antiplatelet Therapy in Patients With Coronary Artery Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines: An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention, 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery, 2012 ACC/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease, 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction, 2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients With Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes, and 2014 ACC/AHA Guideline on Perioperative Cardiovascular Evaluation and Management of Patients Undergoing Noncardiac Surgery*. Circulation, 2016. **134**(10): p. e123-55.
88. Kamran, H., et al., *Oral Antiplatelet Therapy After Acute Coronary Syndrome: A Review*. JAMA, 2021. **325**(15): p. 1545-1555.
89. Acelajado, M.C. and S. Oparil, *Antiplatelet therapy for transient ischemic attack*. J. Clin. Hypertens. (Greenwich), 2012. **14**(2): p. 103-11.

90. EMA. *Zontivity*. 2015 [cited 2022 10.10.2022]; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zontivity>.
91. Sharma, A., et al., *Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress*. *Molecules*, 2019. **24**(13).
92. Taguchi, C., et al., *Estimated Dietary Polyphenol Intake and Its Seasonal Variations among Japanese University Students*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 2019. **65**(2): p. 192-195.
93. Huang, Q., et al., *Dietary Polyphenol Intake in US Adults and 10-Year Trends: 2007-2016*. *J. Acad. Nutr. Diet.*, 2020. **120**(11): p. 1821-1833.
94. Pérez-Jiménez, J., et al., *Dietary intake of 337 polyphenols in French adults*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011. **93**(6): p. 1220-8.
95. Ovaskainen, M.L., et al., *Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults*. *J. Nutr.*, 2008. **138**(3): p. 562-6.
96. Yahya, H.M., et al., *Dietary intake of 20 polyphenol subclasses in a cohort of UK women*. *Eur. J. Nutr.*, 2016. **55**(5): p. 1839-1847.
97. Nascimento-Souza, M.A., et al., *Estimated dietary intake and major food sources of polyphenols in elderly of Viçosa, Brazil: a population-based study*. *Eur. J. Nutr.*, 2018. **57**(2): p. 617-627.
98. Jun, S., S. Shin, and H. Joung, *Estimation of dietary flavonoid intake and major food sources of Korean adults*. *Br. J. Nutr.*, 2016. **115**(3): p. 480-9.
99. Pérez-Jiménez, J., et al., *Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database*. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2010. **64 Suppl 3**: p. S112-20.
100. Del Rio, D., et al., *Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases*. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2013. **18**(14): p. 1818-92.
101. Rodriguez-Mateos, A., et al., *Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update*. *Arch. Toxicol.*, 2014. **88**(10): p. 1803-1853.
102. Rothwell, J.A., et al., *Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database*. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2016. **60**(1): p. 203-11.
103. Boskou, D., M. Tsimidou, and G. Blekas, *5 - Polar Phenolic Compounds*, in *Olive Oil (Second Edition)*. 2006, AOCS Press. p. 73-92.
104. Wood, E., et al., *Blueberries and cardiovascular disease prevention*. *Food Funct.*, 2019. **10**(12): p. 7621-7633.
105. Serino, A. and G. Salazar, *Protective Role of Polyphenols against Vascular Inflammation, Aging and Cardiovascular Disease*. *Nutrients*, 2018. **11**(1).
106. Najjar, R.S., et al., *Berry-Derived Polyphenols in Cardiovascular Pathologies: Mechanisms of Disease and the Role of Diet and Sex*. *Nutrients*, 2021. **13**(2).
107. Potì, F., et al., *Polyphenol Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Disorders: A Review and Meta-Analysis*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019. **20**(2).
108. Gorzynik-Debicka, M., et al., *Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2018. **19**(3).
109. Khan, N. and H. Mukhtar, *Tea Polyphenols in Promotion of Human Health*. *Nutrients*, 2018. **11**(1).
110. Rasines-Perea, Z. and P.L. Teissedre, *Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes*. *Molecules*, 2017. **22**(1).
111. Oudot, C., et al., *CSRP3 mediates polyphenols-induced cardioprotection in hypertension*. *J. Nutr. Biochem.*, 2019. **66**: p. 29-42.
112. Pan, P., et al., *Beneficial Regulation of Metabolic Profiles by Black Raspberries in Human Colorectal Cancer Patients*. *Cancer Prev. Res. (Phila)*, 2015. **8**(8): p. 743-50.
113. Chen, Z., et al., *Metabolism of flavonoids in human: a comprehensive review*. *Curr. Drug Metab.*, 2014. **15**(1): p. 48-61.
114. Cesura, A.M., *Catechol-O-Methyltransferase*, in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007, Elsevier. p. 1-7.

115. Vong, C.I., et al., *All Polyphenols Are Not Created Equal: Exploring the Diversity of Phenolic Metabolites*. J. Agric. Food Chem., 2022. **70**(7): p. 2077-2091.
116. Williams, R., *Species variations in the pathways of drug metabolism*. Environ. Health Perspect., 1978. **22**: p. 133-138.
117. Crozier, A., *Absorption, metabolism, and excretion of (-)-epicatechin in humans: an evaluation of recent findings*. Am. J. Clin. Nutr., 2013. **98**(4): p. 861-2.
118. van de Wetering, K., et al., *Intestinal Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)/Bcrp1 and Multidrug Resistance Protein 3 (MRP3)/Mrp3 Are Involved in the Pharmacokinetics of Resveratrol*. Mol. Pharmacol., 2009. **75**(4): p. 876-885.
119. Gee, J.M., et al., *Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway*. J. Nutr., 2000. **130**(11): p. 2765-71.
120. Roowi, S., et al., *Green Tea Flavan-3-ols: Colonic Degradation and Urinary Excretion of Catabolites by Humans*. J. Agric. Food Chem., 2010. **58**(2): p. 1296-1304.
121. Sánchez-Patán, F., et al., *Determination of Microbial Phenolic Acids in Human Faeces by UPLC-ESI-TQ MS*. J. Agric. Food Chem., 2011. **59**(6): p. 2241-2247.
122. Mullen, W., C.A. Edwards, and A. Crozier, *Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions*. Br. J. Nutr., 2006. **96**(1): p. 107-116.
123. Jaganath, I.B., et al., *The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man*. Free Radic. Res., 2006. **40**(10): p. 1035-1046.
124. Pimpão, R.C., et al., *Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers*. Mol. Nutr. Food Res., 2014. **58**(7): p. 1414-1425.
125. Feliciano, R.P., et al., *Identification and quantification of novel cranberry-derived plasma and urinary (poly)phenols*. Arch. Biochem. Biophys., 2016. **599**: p. 31-41.
126. Mecha, E., et al., *Human bioavailability of phenolic compounds found in common beans: the use of high-resolution MS to evaluate inter-individual variability*. Br. J. Nutr., 2020. **123**(3): p. 273-292.
127. Feliciano, R.P., et al., *Plasma and Urinary Phenolic Profiles after Acute and Repetitive Intake of Wild Blueberry*. Molecules, 2016. **21**(9).
128. Nieman, D.C., et al., *Influence of a polyphenol-enriched protein powder on exercise-induced inflammation and oxidative stress in athletes: a randomized trial using a metabolomics approach*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72215.
129. Fukumitsu, H., et al., *Induction of a physiologically active brain-derived neurotrophic factor in the infant rat brain by peripheral administration of 4-methylcatechol*. Neurosci. Lett., 1999. **274**(2): p. 115-8.
130. Kimura, N., et al., *4-methylcatechol, a potent inducer of nerve growth factor synthesis, protects spiral ganglion neurons from aminoglycoside ototoxicity--preliminary report*. Acta Otolaryngol. Suppl., 1999. **540**: p. 12-5.
131. Nitta, A., et al., *4-methylcatechol increases brain-derived neurotrophic factor content and mRNA expression in cultured brain cells and in rat brain in vivo*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1999. **291**(3): p. 1276-83.
132. Saita, K., et al., *A catechol derivative (4-methylcatechol) accelerates the recovery from experimental acrylamide-induced neuropathy*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996. **276**(1): p. 231-7.
133. Callizot, N., J.M. Warter, and P. Poindron, *Pyridoxine-induced neuropathy in rats: a sensory neuropathy that responds to 4-methylcatechol*. Neurobiol. Dis., 2001. **8**(4): p. 626-35.
134. Hsieh, Y.L., et al., *Enhancement of cutaneous nerve regeneration by 4-methylcatechol in resiniferatoxin-induced neuropathy*. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 2008. **67**(2): p. 93-104.
135. Hsieh, Y.L., et al., *Effects of 4-methylcatechol on skin reinnervation: promotion of cutaneous nerve regeneration after crush injury*. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 2009. **68**(12): p. 1269-81.

136. Sun, M.K. and D.L. Alkon, *Effects of 4-methylcatechol on spatial memory and depression*. Neuroreport, 2008. **19**(3): p. 355-9.
137. Fukuhara, K., et al., *Intracerebroventricular 4-methylcatechol (4-MC) ameliorates chronic pain associated with depression-like behavior via induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*. Cell. Mol. Neurobiol., 2012. **32**(6): p. 971-7.
138. Ishikawa, K., et al., *4-Methylcatechol prevents derangements of brain-derived neurotrophic factor and TrkB-related signaling in anterior cingulate cortex in chronic pain with depression-like behavior*. Neuroreport, 2014. **25**(4): p. 226-32.
139. Gezginci-Oktayoglu, S. and S. Bolkent, *4-Methylcatechol prevents NGF/p75(NTR)-mediated apoptosis via NGF/TrkA system in pancreatic β cells*. Neuropeptides, 2011. **45**(2): p. 143-50.
140. Gezginci-Oktayoglu, S. and S. Bolkent, *Ras signaling in NGF reduction and TNF- α -related pancreatic β cell apoptosis in hyperglycemic rats*. Apoptosis, 2012. **17**(1): p. 14-24.
141. Karatug Kacar, A., S. Gezginci-Oktayoglu, and S. Bolkent, *4-Methylcatechol stimulates apoptosis and reduces insulin secretion by decreasing betacellulin and inhibin beta-A in INS-1 beta-cells*. Hum. Exp. Toxicol., 2018. **37**(11): p. 1123-1130.
142. Furukawa, Y., et al., *4-Methylcatechol-induced heme oxygenase-1 exerts a protective effect against oxidative stress in cultured neural stem/progenitor cells via PI3 kinase/Akt pathway*. Biomed. Res., 2010. **31**(1): p. 45-52.
143. Payton, F., et al., *4-Methylcatechol-induced oxidative stress induces intrinsic apoptotic pathway in metastatic melanoma cells*. Biochem. Pharmacol., 2011. **81**(10): p. 1211-8.
144. Senger, D.R., et al., *Activation of the Nrf2 Cell Defense Pathway by Ancient Foods: Disease Prevention by Important Molecules and Microbes Lost from the Modern Western Diet*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0148042.
145. Pourová, J., et al., *Two flavonoid metabolites, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 4-methylcatechol, relax arteries ex vivo and decrease blood pressure in vivo*. Vascul. Pharmacol., 2018. **111**: p. 36-43.
146. Applová, L., et al., *4-Methylcatechol, a Flavonoid Metabolite with Potent Antiplatelet Effects*. Mol. Nutr. Food Res., 2019. **63**(20): p. e1900261.
147. Najmanová, I., J. Pourová, and P. Mladěnka, *A Mixture of Phenolic Metabolites of Quercetin Can Decrease Elevated Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats Even in Low Doses*. Nutrients, 2020. **12**(1).
148. Bijak, M. and J. Saluk-Bijak, *Flavonolignans inhibit the arachidonic acid pathway in blood platelets*. BMC Complement. Altern. Med., 2017. **17**(1): p. 396.
149. Bahem, R., et al., *Modulation of Calcium Signaling of Angiotensin AT1, Endothelin ETA, and ETB Receptors by Silibinin, Quercetin, Crocin, Diallyl Sulfides, and Ginsenoside Rb1*. Planta Med., 2015. **81**(8): p. 670-8.
150. Demirci, B., et al., *Silymarin improves vascular function of aged ovariectomized rats*. Phytother. Res., 2014. **28**(6): p. 868-72.
151. Li Volti, G., et al., *Effect of silibinin on endothelial dysfunction and ADMA levels in obese diabetic mice*. Cardiovasc. Diabetol., 2011. **10**: p. 62.
152. Kang, J.S., et al., *Silymarin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells*. FEBS Letters, 2003. **550**(1-3): p. 89-93.
153. El-Shitany, N.A., S. El-Haggar, and K. El-desoky, *Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats*. Food Chem. Toxicol., 2008. **46**(7): p. 2422-2428.
154. Taghiabadi, E., et al., *Protective Effect of Silymarin against Acrolein-Induced Cardiotoxicity in Mice*. Evid.-Based Complementary Altern. Med., 2012. **2012**: p. 352091.
155. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am. J. Clin. Nutr., 2005. **81**(1): p. 230S-242S.
156. Okabe, Y., T. Shimazu, and H. Tanimoto, *Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of aglycone-rich fermented soybeans compared with glucoside-rich non-fermented soybeans in Japanese postmenopausal women*. J. Sci. Food Agric., 2011. **91**(4): p. 658-663.

157. Mayo, B., L. Vázquez, and A.B. Flórez, *Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects*. *Nutrients*, 2019. **11**(9): p. 2231.
158. Kim, D.H., et al., *Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities*. *Arch. Pharm. Res.*, 1998. **21**(1): p. 17-23.
159. Ostertag, L.M., et al., *In vitro anti-platelet effects of simple plant-derived phenolic compounds are only found at high, non-physiological concentrations*. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011. **55**(11): p. 1624-36.
160. Chang, M.-C., et al., *Antiplatelet effect of phloroglucinol is related to inhibition of cyclooxygenase, reactive oxygen species, ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012. **263**(3): p. 287-295.
161. Alanko, J., et al., *Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties*. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999. **26**(1-2): p. 193-201.
162. Najmanová, I., et al., *Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats*. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2016. **60**(5): p. 981-91.
163. Authi, K.S., et al., *Ca²⁺ release from platelet intracellular stores by thapsigargin and 2,5-di-(*t*-butyl)-1,4-benzohydroquinone: relationship to Ca²⁺ pools and relevance in platelet activation*. *Biochem. J.*, 1993. **294**(1): p. 119-126.
164. Shibata, K., et al., *Regulation by Protein Kinase C of Platelet-Activating Factor- and Thapsigargin-Induced Calcium Entry in Rabbit Neutrophils*. *Jpn. J. Pharmacol.*, 1994. **66**(2): p. 273-276.
165. Andersen, T.B., et al., *Thapsigargin--from Thapsia L. to mipsagargin*. *Molecules*, 2015. **20**(4): p. 6113-27.