

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Školící pracoviště Katedra farmakologie a toxikologie

Doktorský studijní program Farmakologie a toxikologie

Kandidátka / kandidát Patrícia Alexandra Alves Dias, M.Sc.

Školitelka / školitel prof. Přemysl Mladěnka, PharmD., Ph.D.

Konzultantka / konzultant assoc. prof. Jana Pourová, Pharm.D., Ph.D.

Název disertační práce Studium mechanismů účinků fenolických látek na hladký cévní sval

Kardiovaskulární choroby zahrnující mj. vysoký krevní tlak, ischemickou chorobu srdeční, ischemickou chorobu dolních končetin a cerebrovaskulární choroby zůstávají celosvětově nejčastější příčinou úmrtí. Kromě toho existují predikce, které naznačují další vzestup počtu kardiovaskulárních pacientů v budoucnosti. Z těchto důvodů jsou jednoznačně potřebné nové léčebné postupy s cílem zpomalit nebo zvrátit tento epidemiologický trend.

Fenolické sloučeniny obsahují jednu nebo více hydroxylových skupin na benzenovém jádře. Tyto látky zahrnují a) přírodní sloučeniny jako například potravní polyfenoly a malé fenolické metabolity, u kterých se očekávají příznivé účinky na lidské zdraví, a b) syntetické látky jako např. bisfenoly, u kterých se naopak obáváme možného negativního působení.

I když je k dispozici řada studií ukazujících, že potrava bohatá na polyfenoly je spojena s kardioprotektivními účinky, stále zde zůstává řada nezodpovězených otázek. Především parentní sloučeniny mají nízkou biodostupnost a jejich biologické účinky jsou tak připisovány metabolitům tvořeným lidskou mikroflórou. Kyselina 3-hydroxyfenoctová (3HFO) je malým fenolickým metabolitem, u kterého byl již dříve ex vivo nalezen vasodilatační potenciál. Cílem první část této dizertace je ověřit, zda 3HFO dokáže navodit hemodynamické účinky in vivo a jaký je mechanismus tohoto účinku. Intravenózní podání 3HFO ve formě jak bolusů, tak infuzí navodilo snížení systolického i diastolického krevního tlaku u spontánně hypertenzních potkanů. Tento účinek byl dávkově závislý a nebyl doprovázen vlivem na srdeční frekvenci. Následovaly ex vivo pokusy, kde jako model pro zjištění mechanismu účinku na molekulární úrovni byly vybrány izolované prasečí věnčité tepny s monitorováním isometrického napětí. Pokusy prokázaly, že 3HFO tyto cévy relaxuje. Vasodilatační účinek byl částečně závislý na celistvosti endoteliální vrstvy a významně poklesl při inhibici endotelové syntasy oxidu dusnatého (eNOS). Naopak inhibice malých nebo středních vápníkem-aktivovaných draslíkových kanálů, cyklooxygenas ani L-typu vápníkových kanálů stejně jako antagonismus na muskarinových receptorech vasodilatační účinek 3HFO neovlivnily. Z toho usuzujeme, že pokles krevního tlaku po podání 3HFO zřejmě nastává periferní vasodilatací přes mechanismus, který zahrnuje uvolňování oxidu dusnatého endotelem. Bisfenoly jsou endokrinními disruptory, které se široce používají v průmyslu na produkci polykarbonátových plastů a epoxidových pryskyřic v obalových potravinářských materiálech, nápojových plechovkách, speciálním účtenkovém papíru, elektrických přístrojích apod. Jelikož hlavní zástupce, bisfenol A (BPA), je podezřelý z řady škodlivých účinků na lidské zdraví, byl nahrazen novějšími látkami, nazývanými další generací bisfenolů. Tyto alternativní látky jsou sice ještě relativně málo prozkoumány, ale v současné době se již běžně vyskytují v životním prostředí. Druhá část této disertační práce je věnována nejprve systematickému shrnutí dostupné literatury na téma bisfenoly a jejich potenciálnímu vlivu na kardiovaskulární systém. Díky přítomnosti v řadě předmětů denního užívání, jsou lidé těmto látkám nevyhnutelně exponováni. V souladu s tím byly nalezeny v řadě lidských biologických vzorků. Celková sérová hladina BPA (tj. včetně konjugovaných metabolitů) byla naměřena až ~ 430 nM, zatímco u volného BPA to bylo do 80 nM.

I když o hladinách látek z další generace bisfenolů existuje méně dostupných informací, počet studií v této oblasti se zvyšuje. Například pro bisfenol S byla zjištěna maximální sérová hladina ~ 680 nM. In vitro studie dále prokázaly, že bisfenoly interagují s iontovými kanály a také s tyroidními, estrogenními a androgenními receptory. V případě BPA byly popsány vasodilatační účinky ex vivo, zatímco v in vivo a observačních prevalenčních studiích byl překvapivě zjištěn nárůst arteriálního krevního tlaku. Další popsané nepříznivé účinky byly ve vztahu k jaternímu metabolismu lipidů i metabolismu glukosy a k ischemické chorobě srdeční. V dostupných výsledcích jsou nesrovnalosti nebo dokonce vyznívají protichůdně. Z tohoto důvodu jsou potřeba další studie zaměřené především na novou generaci bisfenolů. Další část tohoto doktorandského projektu se soustředí na 14 bisfenolů (bisfenoly A, AF, AP, B, BP, C, E, F, G, M, P, PH, S a Z) a porovnává jejich účinky in vitro (lidské a potkaní buněčné linie), ex vivo (isolovaná potkaní aorta) a in vivo (Wistar Han potkaní akutně nebo chronicky exponovaní buď nízkým /environmentálním/ dávkám nebo vysokým toxickým dávkám). Osm z testovaných bisfenolů relaxovalo potkaní aortu s různou potencí. Bisfenol AF (BPAF) byl nejúčinnější. Jeho EC50 byla 57 μ M, a mechanismus účinku závisel na blokádě L-typu vápníkových kanálů. Cytotoxicita bisfenolů na čtyři lidské a potkaní buněčné linie (H9c2, A-10, MCF7/S0.5 a MCF7/182R-6) byla variabilní a pozorována v koncentracích od mikromolárních až po milimolární. Proto jsme očekávali, že některé z těchto látek by mohly mít vliv na arteriální krevní tlak a navodit poškození srdce. Avšak in vivo akutní účinky tří dávek (0.005, 0.05 a 2.5 mg/kg) nejúčinnější látky BPAF a jeho tří dalších analogů (bisfenoly A, S a F) na kardiovaskulární systém byly biologicky spíše zanedbatelné. BPAF jsme kromě toho podávali i chronicky v dávce 2.5 mg/kg denně po dobu 4 týdnů normotenzním potkanům Wistar Han, ale ani v tomto experimentu nebyl pozorován významný vliv na arteriální krevní tlak. Závěrem lze tedy konstatovat, že ačkoliv bisfenoly relaxují hladké cévní svaly, účinné koncentrace, které by navodily jasné kardiovaskulární účinky, jsou výrazně vyšší, než běžná biologická expozice. Následuje stručný souhrn záměrů práce, použitých metod, dosažených výsledků a učiněných závěrů