Utjecaj začinskog bilja porodice Lamiaceae na agregaciju trombocita

Bobetić, Vanessa

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:100402

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Vanessa Bobetić

Utjecaj začinskog bilja porodice Lamiaceae na agregaciju trombocita

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija lijekova, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirze Bojića.

Zahvaljujem se mentoru, doc. dr .sc. Mirzi Bojić i Andrei Antolić, univ. mag.pharm na stručnom vodstvu i pomoći u pisanju ovog rada.

Nikad neću moći dovoljno zahvaliti najbitnijoj osobi zadnjih devet godina-mojemu B. Hvala ti, da nije bilo tebe, danas ne bih držala ovu diplomu u rukama i bez tebe sve ovo ne bi imalo smisla.

Hvala mami što je čekala iako sam svaki put rekla da ne dolazim doma jer moram učiti.

Hvala Antoniji, najslučajnijem čudu koje je preokrenulo moj život prije tri godine.

Hvala svim mojim prijateljima. Znam da nije bilo lako prolaziti sve ovo zajedno.

Jedna istovremeno teška, a opet prekrasna avantura se zatvara.

Počinje jedna nova i neizmjerno sam zahvalna na tome.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Polifenoli - flavonoidi i fenolne kiseline 2
1.1.1. Podjela i farmakološko djelovanje flavonoida 3
1.1.2. Podjela i osnovna struktura fenolnih kiselina 6
1.2. Začinsko bilje porodice Lamiaceae 7
1.3. Agregacija trombocita 10
1.4. Pregled antiagregacijske terapije 12
1.5. Metode praćenja agregacije trombocita 14
1.5.1. Agregometrija 14
1.5.2. Analizator trombocitne funkcije 14
1.5.3. Lumiagregometrija 15
1.6. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa 16
2. OBRAZLOŽENJE TEME 17
3. MATERIJALI I METODE 20
3.1. Uzorci 21
3.2. Kemikalije 22
3.2.1. Priprema uzoraka ispitivanih biljnih vrsta 22
3.3. Instrumenti i laboratorijski pribor 23
3.4. Metode 25
3.4.1. Metoda praćenja agregacije trombocita 25
3.4.2. Određivanje minimalne antiagregacijske koncentracije 30
3.4.3. Kvalitativna analiza biljnih vrsta tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrijom masa 31
4. REZULTATI 32
4.1. Rezultati impedancijske agregometrije 33
4.2. Rezultati kvalitativne analize ekstrakata biljnih vrsta 39
5. RASPRAVA 44
5.1. Usporedna istraživanja 46
5.2. Prednosti i ograničenja istraživanja 47
6. ZAKLJUČAK 48
7. LITERATURA 50
8. SAŽETAK/SUMMARY 54
9. PRILOG 57
9.1. Informirani pristanak 57
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD .....

POPIS KRATICA

ADP - adenozin difosfat

ATP – adenozin trifosfat

AU – arbitrarna jedinica**,** engl. *arbitrary unit*

AUC – površina ispod krivulje, engl. *area under curve*

COX -1 – ciklooksigenaza 1

MINaAC – minimalna antiagregacijska koncentracija

TRAP-6 – aktivator trombinskog receptora za peptid 6, engl. *thrombin receptor activator for peptide 6*

TxA_2 – tromboksan A_2

vWf – von Willebrandov faktor

1. UVOD

Traganje čovjeka za ljekovitim tvarima iz prirode seže u daleku prošlost, s ciljem pronalaska rješenja odnosno izlječenja bolesti. Danas nije ništa drugačije. Više od sedam milijardi ljudi, na tisuće različitih lijekova na tržištu sa svojim indikacijama i nuspojavama i stotine bolesti čija etiologija još uvijek nije u potpunosti ili barem djelomično razjašnjena. Ubrzan tempo života, stres, pretilost, pušenje i manjak tjelesne aktivnosti u pozadini su 31% smrtnih slučajeva u svijetu -17,9 milijuna ljudi godišnje umire kao posljedice komplikacije istih (www.who.int). Prema studiji *European Observatory on Health System and Policies - Croatia: Country Health Profile 2017, State of Health in the EU* u Hrvatskoj je u 2017. godini zabilježen dvostruko veći rizik od kardiovaskularnih bolesti i jedna od najviših stopa smrtnosti u odnosu na prosjek zemalja Europske unije (www.ec.europa.eu).
Većina suvremenih lijekova razvijena je iz izoliranih spojeva ljekovitog bilja. Kao neograničen izvor novih i složenih kemijskih struktura, ljekovito bilje sve više dobiva na važnosti i sve veći broj literaturnih podataka ukazuje na njihove potencijalne prednosti s manjim rizikom od komplikacija u odnosu na već postojeće lijekove.

Veliki interes za istraživanja pokazuju i polifenoli kao sastavnica mnogih biljaka zbog njihovog antioksidativnog, protuupalnog, antitumorskog, antihipertenzivnog, neuroprotektivnog, antidijabetičkog i antiagregacijskog djelovanja (Andrade i sur., 2018).
Terapija kardiovaskularnih bolesti je najčešće doživotna i teži se pronalasku učinkovitije i sigurnije terapije kako bi se održala odnosno povećala kvaliteta života pacijenta.
Međutim, faktor prirodne varijabilnosti u razini spojeva prisutnih u biljkama te njihova izolacija u vrlo malim količinama glavno su ograničenje uporabe biljaka. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi uporaba ljekovitog bilja kao fitofarmaceutika poprimila istu razinu važnosti kao ostali farmaceutski proizvodi. (Opara i Chohan, 2014).

1.1. POLIFENOLI – FLAVONOIDI I FENOLNE KISELINE

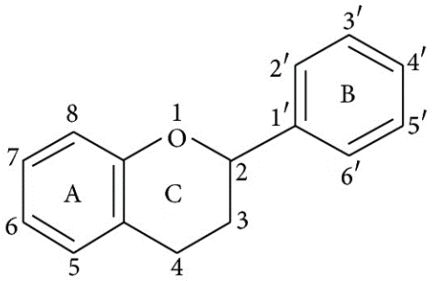
Biljke sintetiziraju polifenole kao odgovor na stresne uvjete povećavajući otpornost prema različitim mikroorganizmima, za zaštitu od UV zračenja, za pigmentaciju, rast i razmnožavanje. Podjela polifenola u užem smislu, kao velike skupine strukturno različitih spojeva s najmanje jednim aromatskim prstenom i s vezanom jednom ili više hidroksilnih skupina, je na flavonoide i fenolne kiseline.

Već su stoljećima poznati blagotvorni utjecaji polifenolnih spojeva na zdravlje. Preko 4000 flavonoida je izolirano iz biljnog materijala od kojih ih vjerojatno nema samo u algama. Flavonodi su najvećim dijelom zastupljeni u svim dijelovima biljke, dok manji dio čine fenolne kiseline. Polifenoli daju boju laticama, listovima i plodovima dok ih ljudi i životinje ne mogu sintetizirati. Najčešće ih nalazimo u voću, povrću, žitaricama, vinu. Zbog izrazite brojnosti i različite strukture pripisuje im se širok spektar djelovanja poput protuupalnog, antitumorskog, hepatoprotektivnog, spazmolitičkog, diuretičkog te su jedni od najvažnijih prirodnih antioksidansa. Pokazali su i pozitivan učinak u sprječavanju ateroskleroze i liječenju mnogih kardiovaskularnih bolesti.

Polifenoli su danas smatrani nezamjenjivim komponentama u raznim farmaceutskim, kozmetičkim, medicinskim i nutritivnim primjenama (Marković, 2010., Panche i sur., 2016).

1.1.1. PODJELA I FARMAKOLOŠKO DJELOVANJE FLAVONOIDA

Osnovna struktura flavonoida ima oblik C_6-C_3-C_6. Dva benzenska prstena (A i B) povezana su preko heterocikličkog piranskog prstena (C). Skupine flavonoida razlikuju se po položaju prstena B, supstituciji i stupnju oksidacije prstena C dok razlike unutar skupine flavonoida ovise o supstituciji prstena A i B (slika 1).

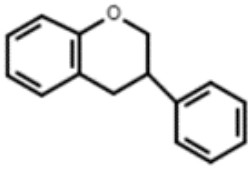
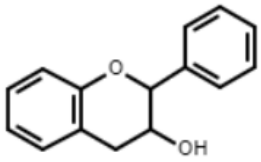
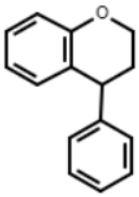
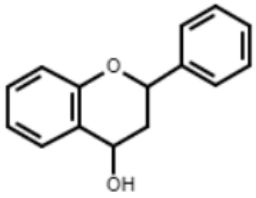
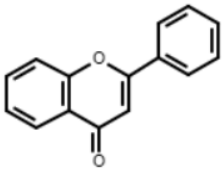
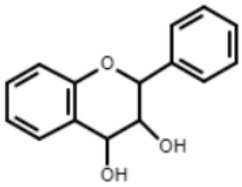
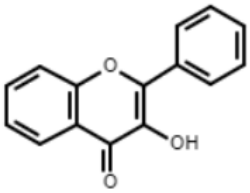
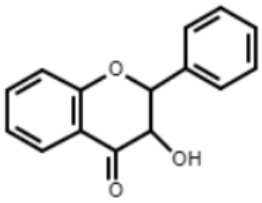
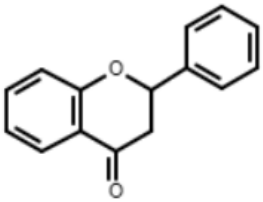
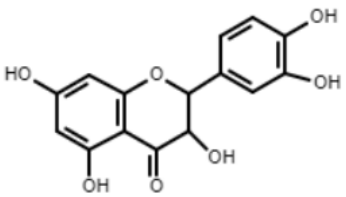
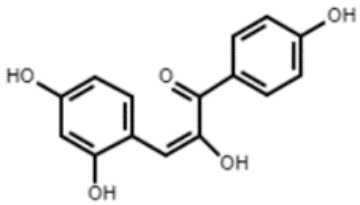


Slika 1: Osnovna struktura flavonoida. (Preuzeto iz Kumar i Pandey, 2013).

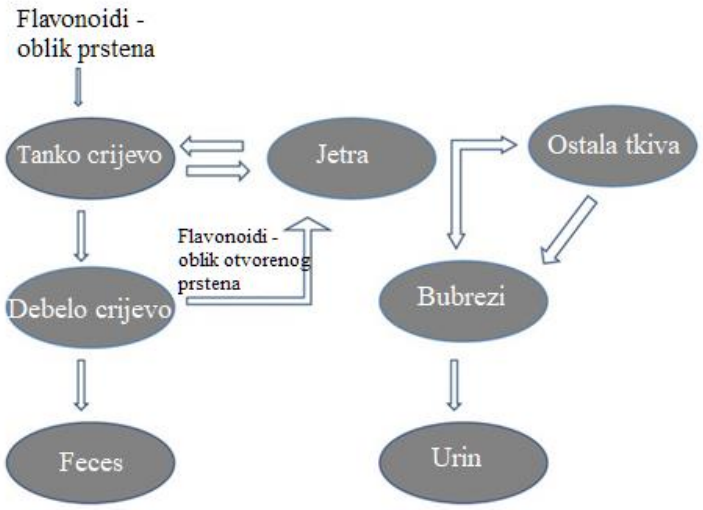
Flavonoidi mogu postojati kao aglikoni, glikozidi i metilirani derivati. Metilni esteri i acetil esteri alkoholne skupine se javljaju u prirodi dok formiranjem glikozida, glikozidna veza se smješta na položajima 3 ili 7. Šećerna komponenta u strukturi može biti glukoza, ramnoza, glukoramnoza, galaktoza ili arabinoza.

Flavonoidi u kojima je B prsten vezan na položaju 3 prstena C se nazivaju izoflavoni, dok na položaju 4 se nazivaju neoflavonoidi. Podjela flavonoida u slučaju kada je B prsten vezan na položaju 2 je na flavone, flavonole, flavanone, flavanonole, katehine i antocijanine. (Kumar i Pandey, 2013). Strukturna podjela flavonoida prikazana je u tablici 1.

Tablica 1: Strukturna podjela flavonoida

Flavonoid	Struktura	Flavonoid	Struktura
Izoflavonoid		**Flavan-3-ol**	
Neoflavonoid		**Flavan-4-ol**	
Flavon		**Flavan-3,4-ol**	
Flavonol		**Flavanonol**	
Flavanon		**Katehin**	
		Antocijan	

Ovisno o izvoru hrane, njihovim fizičko-kemijskim svojstvima, flavonoidi se različito apsorbiraju. Nakon apsorpcije u tankom ili debelom crijevu, flavonoidi se konjugiraju u jetri procesima glukuronidacije, suflatacije, metilacije ili se metaboliziraju u manje fenolne spojeve te se ne nalaze u slobodnom obliku u plazmi ili urinu (slika 2).



Slika 2: Proces apsorpcije i metabolizma flavonoida. (Preuzeto i prilagođeno prema Kumar i Pandey, 2013)

Biološka aktivnost flavonoida ovisi o strukturnim značajkama, stupnju hidroksilacije, supstitucije, konjugacije i stupnju polimerizacije. Šećerna komponenta flavonoida važna je za njihovu bioraspoloživost čime izoflavoni pokazuju najveću bioraspoloživost.

Antioksidativni učinak flavonoida se temelji na inhibiciji enzima poput mikrosomalne monooksifenaze, glutation-S-transferaze, NADH oksidaze u procesu stvaranja reaktivnih radikala te keliranja metala (bakar, željezo) koji se vežu za funkcionalne hidroksilne skupine na prstenovima flavonoida. Pokazano je da su aglikoni jači antioksidansi od glikozida iako se antioksidacijski učinak glikozida može povećati glukoznom skupinom. Povećani stupanj polimerizacije flavonoida povećava učinkovitost protiv različitih vrsta radikala.

Istraživanja su pokazala značajno hepatoprotektivno djelovanje kod silimarina koji stimulira aktivnost DNA ovisne RNA polimeraze 1 rezultirajući u biosintezi DNA, straničnoj proliferaciji i regeneraciji oštećene jetre.

Protuupalno djelovanje posljedica je inhibicije mnogih enzima kao što su ksantin oksidaza, ciklooksigenaza, lipoksigenaza i fosfoinozitid 3-kinaza. Indukcijom zaštitnih ljudskih

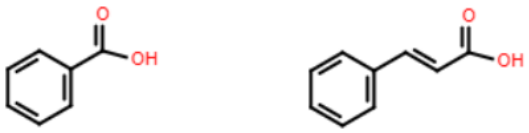
enzimskih sustava, flavonoidi pokazuju zaštitni učinak protiv mnogih bakterijskih, virusnih i degenerativnih bolesti. Flavonoidi bobičastog voća pokazali su pozitivan učinak na Parkinsonovu bolest i poboljšanje pamćenja. Kao arome, boje i antioksidansi djeluju na stabilnost i kvalitetu hrane (Kumar i Pandey, 2013).

1.1.2. PODJELA I OSNOVNA STRUKTURA FENOLNIH KISELINA

Fenolne kiseline se mogu podijeliti u dvije skupine- derivate benzojeve kiseline s osnovnom strukturom C_6-C_1 i na derivate cimetne kiseline s osnovnom strukturom C_6-C_3 (slika 3). U prirodi se najčešće nalaze u esterificiranom obliku.

Neki od derivata benzojeve kiseline su salicilna, vanilinska, galna kiselina dok su derivati cimetne kiseline ferulična, kavena i kumarinska kiselina (Tsao, 2010).

Benzojeva kiselina Cimetna kiselina



Slika 3: Osnovne strukture fenolnih kiselina

1.2. ZAČINSKO BILJE PORODICE LAMIACEAE

MENTHA x PIPERITA L, LAMIACEAE- paprena metvica

Mentha x piperita L., Lamiaceae kao hibrid vrste *M. aquatica* i *M. spicicata* susreće se kao kultivirana, ali i samonikla biljka. Tijekom povijesti metvica se koristila za liječenje kolere, kao afrodizijak, za sprječavanje začeća. Američka mornarica je eterično ulje metvice koristila za ispitivanje plinskih maski.

Glavne sastavnice mentol i metil salicilat imaju antispazmatski učinak na želudac i gastrointestinalni trakt zbog djelovanja na kalcijeve kanale glatkih mišićnih stanica (Schaffner i sur., 1999).

ORIGANUM VULGARE L., LAMIACEAE- mravinac

Višegodišnja aromatska biljka, porijeklom iz brda aromatskih zemalja i zapadne Azije. Glavni sastojci eteteričnog ulja su timol koji je zaslužan za opuštanje tkiva grla i želuca te karvakrol. U listovima biljke možemo najviše naći spojeve antioksidativnog djelovanja poput ružmarinske kiseline (Oniga i sur., 2018).

ROSMARINUS OFFICINALIS L., LAMIACEAE- ružmarin

U povijesti se ružmarin koristio kao ljekovito sredstvo protiv žutice, plućnih oboljenja, otežane probave. Danas se koristi u kulinarstvu zbog svoje karakteristične arome, ali i u tradicionalnoj medicini za sprječavanje i liječenje prehlade, bolova mišića i zglobova.

Droga ružmarina kao biljke Sredozemlja s vremenom cvatnje od ožujka do listopada, sastoji se od svježih ili osušenih listova, sabranih tijekom ili nakon cvatnje.

R. officinalis L., Lamiaceae se uglavnom sastoji od fenolnih spojeva, di- i triterpena te eteričnih ulja (Schaffner i sur., 1999).

Široki spektar farmakološke aktivnosti uključuje antibakterijsko, antidijabetičko, antitumorsko, antioksidativno i protuupalno djelovanje. Europska unija je odobrila ekstrakt ružmarina i klasificirala ga kao siguran i učinkovit prirodan antioksidans E392 (Andrade i sur., 2018).

OCIMUM BASILICUM L., LAMIACEAE – bosiljak

Naziv bosiljak je grčkog podrijetla i znači »kraljevski« te zbog šireg spektra kemotipova, eterična ulja bosiljka se ne mogu označavati samo kao » eterično ulje bosiljka«. Eterično ulje se dobiva destilacijom vodenom parom nadzemnog dijela biljke. Ovisno o kemotipovima, eterično ulje može biti bogato metoksifenolima i djelovati spazmolitički, protuupalno i analgetički. Europski i egipatski varijeteti su bogati linaolom i 1,8-cineolom i djeluju kao stimulirajuća sredstva za cijeli organizam, potičući probavu i funkciju jetre. Za infekcije probavnog sustava najbolji su varijeteti bogati aldehidima (Marković, 2010).

CALAMINTHA NEPETA L., LAMIACEAE – gorska metvica

Calamintha nepeta L., Lamiaceae je rasprostranjena na području Mediterana. Droga se sastoji od osušenih listova koji sadrže flavonoide i koriste se za liječenje gastroenteritisa i respiratornih bolesti. Za antimikrobnu aktivnost odgovorni su terpenoidi dok su vodeni ekstrakti pokazali visoki alelopatski potencijal s potencijalnom primjenom za kontrolu korova. Istraživanjima se pokazalo da metanolni ekstrakti vrste *Calamintha nepeta* L., Lamiaceae djeluju fitotoksično. (Araniti i sur., 2013).

LAVANDULA ANGUSTIFOLIA L., LAMIACEAE - lavanda

Pravu vrstu lavande, *Lavanda angustifolia* L., Lamiaceae , karakterizira duga tradicija upotrebe u aromaterapiji za opuštanje, ublažavanje tjeskobe te se preporučuje za inhalaciju i liječenja faringitisa zbog svojih analgetskih i antiseptičkih svojstva. Istraživanjima je pokazano da sastavnice linalol i terpineol imaju deprimirajući učinak na središnji živčani sustav. Nadalje, *in vitro* studija je pokazala da vodeni ekstrakt lavande u kojemu je pronađeno najviše kavene kiseline i luteolin-7-glikozida, ovisno o dozi, inhibira formiranje Aβ plakova u mozgu te poboljšava učenje i pamćenje (Soheili i Salami, 2019).

MELISSA OFFICINALIS L., LAMIACEAE – matičnjak

Samonikla je biljka Mediterana s vremenom cvatnje od lipnja do kolovoza, ali je danas naturalizirana širom cijelog svijeta. Tijekom povijesti se koristila za liječenje zubobolje, za bolove u zglobovima i pseće ugrize, kod dizenterije. U pučkoj medicini se koristi kod poremećaja sna, prehlada i kod uboda osa i pčela.

Droga se sastoji od osušenih listova dok su glavne sastavnice eterično ulje, tanini, triterpenske kiseline, gorke tvari i flavonoidi s umirujućim, karminativnim i antivirusnim djelovanjem. (Schaffner i sur., 1999).

SALVIA OFFICINALIS L., LAMIACEAE - kadulja

Rasprostranjenost kadulje je na području južne i srednje Europe, ali je i naturalizirana i u ostalim dijelovima svijeta. Možemo ju naći kao samoniklu ili se uzgaja s vremenom cvatnje od svibnja do srpnja. Koristi se kod upale sluznice usta i ždrijela, dispeptičnih tegoba te smanjuje znojenje. (Schaffner i sur., 1999). Zadnjih nekoliko godina ova je biljka predmet intenzivnih istraživanja zbog širokog spektra djelovanja uključujući antikancerogeno, antimikrobno, antioksidativno, protuupalno te hipoglikemijskog i hipolipidemijskog učinka.

Nekad su se osim listova koristili i cvjetovi i sjemenke kadulje dok se vino od kadulje koristilo kod oštećenja jetre, kožnih osipa, gihta. U pučkoj medicini koristi se za snižavanje šećera u krvi te se zbog supresivnog učinka koristi za lakše odvikavanje djeteta od majčinog mlijeka. Široki raspon fitokemikalija u cvjetovima, lišću i stabiljci *S. officinalis* uključuje alkaloide, ugljikohidrate, masne kiseline, fenolne spojeve, steroide.

Alkoholni i vodeni ekstrakti bogati su flavonoidima posebice luteolin-7-glukozidom i ružmarinskom kiselinom te fenolnim kiselinama poput kavene kiseline (Ghorbani i Esmaeilizadeh, 2017).

Kod dugotrajnijeg korištenja alkoholnih ekstrakata i čistih eteričnih ulja može doći do pojave epilepsijskih grčeva, tahikardije ili vrtoglavice zbog djelovanja tujona (Schaffner i sur., 1999).

1.3. AGREGACIJA TROMBOCITA

Hemostaza je regulirani fiziološki proces zaslužan za sprječavanje krvarenja na mjestu oštećene krvne žile s ciljem održavanja normalnog protoka krvi. Primarna hemostaza se odnosi na višestruke procese agregacije trombocita i stvaranje trombocitnog čepa dok sekundarna hemostaza uključuje taloženje netopljivog fibrina i stvaranje fibrinske mreže i posljedično stabilizaciju krvnog ugruška. Procesi hemostaze aktiviraju se unutar sekunde nakon oštećenja krvne žile i međusobno se isprepliću. Razumijevanje hemostaze od ključne je važnosti za korištenje postojećih, ali i za razvoj novih lijekova (Gale, 2011).

U normalnim uvjetima i kod normalnog protoka krvi, trombociti se ne agregiraju ni ne lijepe na stijenke krvnih žila dok oštećenjem krvne žile dolazi do adhezije i agregacije trombocita.

Ozljedom stijenke krvne žile dolazi do kontrakcije glatkog mišića u stijenci žile i smanjenja otjecanja krvi. Kontrakcija nastaje kao posljedica lokalnog miogenog spazma, lokalnih čimbenika iz oštećenog tkiva i trombocita te živčanih refleksa.

Trombociti ili krvne pločice su aktivne strukture koje nastaju u koštanoj srži iz megakariocita, poluživota od 8 do 12 dana. Iako bez jezgre i bez mogućnosti dijeljenja, trombociti u svojoj citoplazmi sadrže aktivne čimbenike poput kontraktilnih bjelančevina aktina, miozina i trombostenina. Trombociti također sadrže i ostatke endoplazmatske mrežice i Golgijevog aparata zaslužne za sintezu nekih enzima i pohranu kalcijevih iona, zatim mitohondrijski i enzimatski sustav za stvaranje adenozin trifosfata i adenozin difosfata (ATP i ADP).

Stvaranje trombocitnog čepa temelji se na promjeni površine i oblika trombocita u dodiru s oštećenim endotelom krvne žile (slika 4). Nabubreni trombociti nepravilnog oblika vežu se za inače nedostupnu bjelančevinu nazvanu von Willebrandov faktor i tkivni kolagen iz dubljih slojeva. Trombociti luče i velike količine ADP, tromboksana A_2 potrebne za aktivaciju susjednih trombocita čineći ih ljepljivima te dolazi do stvaranja rahlog trombocitnog čepa dovoljnog za zatvaranje malih pukotina oštećenih stijenki krvnih žila. U procesu zgrušavanja fibrinske niti svojim pričvršćivavanjem na trombocite stvoraju nepropustan čep.

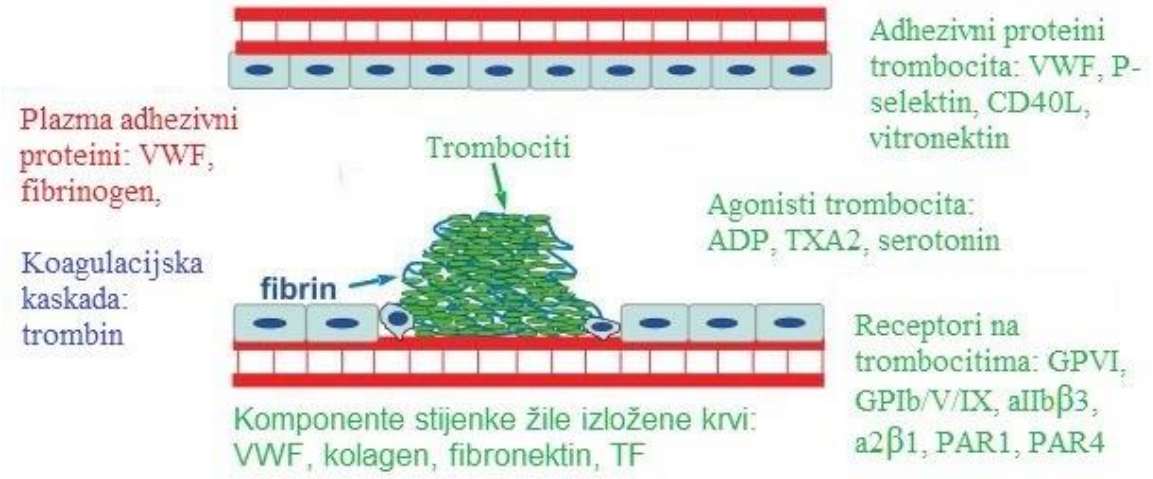
Kao posljedica oštećenja krvne žile dolazi i do aktivacije složene kaskade kemijskih reakcija u kojima sudjeluje širok spektar koagulacijskih faktora. Pojednostavljeno, prvo nastaje aktivator protrombina koji je zaslužan za pretvorbu protrombina u aktivni trombin u prisustvu dovoljne količine kalcijevih iona. Protrombin je po strukturi bjelančevina plazme koja se neprestano

stvara u jetri i troši za zgrušavanje krvi. Za normalno stvaranje protrombina potrebne su dovoljne količine vitamina K. Protrombin se također veže na protrombinske receptore na trombocitima vezanim za oštećeni endotel.

Trombin uzrokuje polimerizaciju fibrinogena u fibrinske niti odcjepljivanjem četiri peptida male molekulske mase iz svake molekule fibrinogena. Fibrinogen je također bjelančevina koja se stvara u jetri.

Slabe nekovalentne vodikove veze su karakteristične za rane faze polimerizacije i ugrušak se može raspasti, dok u drugoj fazi trombin aktivira faktor stabilizacije fibrina i dolazi do učvršćivanja fibrinske mrežice.

Jednom stvoreni ugrušak širi se i u okolnu krv i dolazi do pokretanja pozitivne povratne sprege. Sam trombin proteolitički djeluje ne samo na fibrinogen i neke druge faktore zgrušnjavanja, već i izravno na protrombin čime dolazi do stvaranja sve više trombina i povećanja ugruška dok krvarenje ne prestane (Guyton i Hall, 2012).



Slika 4: Agregacija trombocita na mjestu ozljede. (Preuzeto i prilagođeno prema Gale, 2011).

1.4. PREGLED ANTIAGREGACIJSKE TERAPIJE

Postoji značajan broj lijekova koji svojim različitim mehanizmima mogu utjecati na put zgrušavanja krvi i agregaciju trombocita iako se i dalje traga za novijim, učinkovitijim i sigurnijim lijekovima. Istraživanjima je pokazano da flavonoidi pokazuju značajnu dobrobit za zdravlje, između ostalog i antiagregacijski učinak.

Okidači poput ubrzanog načina života, nepravilne prehrane, manjka tjelesne aktivnosti i genetskih faktora doprinose poremećaju hemostaze i posljedično do srčanog i moždanog udara, duboke venske tromboze i plućne embolije. Puknućem i odvajanjem aterosklerotskog plaka od krvne žile dolazi do pokretanja procesa agregacije trombocita, koagulacijske kaskade i stvaranja tromba.

Pronađeno je više od 50 tvari u krvi i tkivima koji utječu na zgrušavanje krvi. Tvari koje pospješuju koagulaciju nazivaju se prokoagulancije i aktiviraju se u slučaju ozljede žile, dok tvari koje je sprječavaju se zovu antikoagulancije i prevladavaju u normalnom protoku krvi. Manjkom bilo kojeg faktora zgrušavanja krvi može doći do obilnog krvarenja kod ljudi, ali isto tako i do stvaranja tromba. Tromb, kao abnormalni ugrušak, zbog stalnog protoka krvi može se odvojiti od krvne žile i dospijeti u druge dijelove tijela i blokirati protok krvi te začepiti arterije u bubrezima, mozgu, plućima i ostalim organima što za posljedicu može biti smrtonosno (Guyton i Hall, 2012).

Acetilsalicilna kiselina (ASA) djeluje inhibicijom enzima ciklooksigenaze, bitnog u stvaranju tromboksana A_2 u metabolizmu arahidonske kiseline. Tromboksan A_2 ima vazokonstriktivni učinak, izaziva agregaciju trombocita, ali i pojačava djelovanje agonista trombocita poput trombina.

Inhibicija ciklooksigenaze 2 u nižim dozama acetilsalicilnom kiselinom ima antiagregacijski učinak. Više doze acetilsalicilne kiseline djeluju na inhibiciju ciklooksigenaze 1 i imaju analgetski i protuupalni učinak.

Dnevna doza kojom se postiže antiagregacijski učinak je od 75 do 100 mg, ali se i dvostruko povećava rizik od krvarenja iz gastrointestinalnog sustava zbog inhibicije funkcije trombocita i smanjenje citoprotekivog učinka prostaglandina E2. Istraživanjima je pokazan profilaktički učinak acetilsalicilne kiseline kod stabilne i nestabilne angine pektoris, nakon preboljelog infarkta miokarta te moždanog udara.

Tienopiridini poput klopidogrela, prasugrela, tikagrelora, tiklopidina inhibiraju agregaciju trombocita induciranu adenozin difosfatom, ali za razliku od acetilsalicilne kiseline, ne utječu

na ciklus arahidonske kiseline. Ireverzbilno blokiraju vezanje ADP na P_2Y_{12} receptor. Tiklopidin u odnosu na klopidogrel, ima lošiji profil sigurnosti i uzrokuje mnoge nuspojave kao što su poremećaj jetrene funkcije i neutropenija.

U kombinaciji s acetilsalicilnom kiselinom, klopidogrel se koristi za prevenciju aterotrombotskih događaja u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom. ASA i klopidogrel su ireverzibilni inhibitori agregacije trombocita i njihov učinak traje koliko je i životni vijek trombocita što može izazvati krvarenja uslijed pogrešne doze.

Nedostatak klopidogrela jest i forma prolijeka koji za aktivaciju prije svega koristi CYP2C19 koji je podložan genetskom polimorfizmu što ujedno smanjuje odgovor na terapiju.

Tikagrelor je noviji lijek i djeluje kao reverzibilni blokator receptora ADP-a na trombocitima.

Antagonisti glikoproteinskih receptora novija su skupina lijekova koji djeluju inhibicijski na integrin-adhezijski receptor i blokiraju povezivanje trombocita s fibrinogenom i von Willebrandovim faktorom. Lijekovi iz te skupine se koriste intravenski, uz istodobnu primjenu heparina, imaju povišeni rizik od krvarenja i izrazito su skupi. Unatoč tome, danas se najviše koriste abciksimab, tirofiban i eptifibatid i učinkoviti su za smanjenje agregacije trombocita kod bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (Bergovec i Vražić, 2010).

1.5. METODE PRAĆENJA AGREGACIJE TROMBOCITA

1.5.1. Agregometrija trombocita

Smatrana zlatnim standardom, optička agregometrija koristi se za mjerenje agregacije trombocita u plazmi bogatoj trombocitima (PRP) u ispitivanjima nasljednih i stečenih poremećaja funkcije trombocita. Ispituje se funkcija trombocita *in vitro* mjerenjem razlike u transmisiji svjetla fotometrom nakon dodatka agonista u plazmu bogate trombocitima. Uzorcima se može dodati širok raspon agonista među kojima su najčešći ADP, arahidonska kiselina, adrenalin, kolagen ili ristocetin. Kao rezultat se dobiva krivulja agregacijskog indeksa koja prikazuje promjene intenziteta u transmisiji uzoraka s maksimalnim opsegom agregacije u postotcima na y-osi i izmjerenim minutama na x-osi.

Nedostatak ove metode je potreba za standardizacijom i samim time otežana interpretacija rezultata u različitim laboratorijima, potreba za velikom količinom uzorka, dugotrajna i složena priprema uzorka i mogućnost aktivacije trombocita *in vitro* (Koltai i sur., 2017).

1.5.2. Analizator trombocitne funkcije

Optička agregometrija se pokazala korisnom u kombinaciji s analizatorom funkcije trombocita za otkrivanje rezidualne aktivnosti trombocita.

Analizatori *PFA-100* i Innovance *PFA-200* mjere funkciju trombocita u uvjetima koji simuliraju protok krvi u krvnoj žili. Mali volumen krvi se usisava kroz otvor membrane obložene kombinacijom ADP i kolagena (patrona CADP) ili kolagena i adrenalina (patrona CEPI). CEPI se koristi za ispitivanje disfunkcije trombocita uzrokovane lijekovima, intrizičnim nedostacima trombocita ili nedostatkom VWF dok se CADP koristi u slučaju nenormalnih rezultata mjerenih CEPI metodom.

Visoke brzine smicanja zbog usisavanja krvi kroz mali otvor uzrokuju vezanje, aktivaciju i agregaciju trombocita i stvaranja trombocitnog čepa. Uređaj mjeri smanjenje protoka krvi i vrijeme potrebno za postizanje potpunog zatvaranja otvora (CT-*closing time*). Iako su potrebne male količine uzorka pune krvi i metoda je relativno brza i jednostavna, postotak hematokrita, broj trombocita i razina von Willebrandovog faktora mogu značajno utjecati na vrijeme

zatvaranja. Kraće vrijeme zatvaranja ukazuje na povećanu rezidualnu aktivnost trombocita kod pacijenata na terapiji acetilsalicilnom kiselinom (Nguyen i sur., 2016).

Impedancijska agregometrija trombocita je metoda kojom se procjenjuje agregacijska funkcija trombocita. Mjeri se promjena električnog otpora između dva para srebrnih elektroda nakon dodatka agonista koji induciraju agregaciju trombocita. Povećana agregacija trombocita se očituje povećanom električnom impedancijom.

Temelji na impedancijskoj agregometriji s višestrukim elektrodama za istodobno mjerenje više različitih uzoraka. Koristi se za procjenu rizika predoperativnog i intraoperativnog krvarenja pacijenata te za praćenje antitrombocitnih terapija.

Prednosti metode su u malim količinama uzorka pune krvi čime se postiže utjecaj drugih krvnih elemenata na agregaciju trombocita i izbjegava se dodatna priprema suspenzije trombocita. Broj trombocita, leukocita, visoke koncentracije agonista u odnosu na optičku metodu samo su neke od ograničenja ove metode (Paniccia i sur., 2009).

1.5.3. Lumiagregometrija

Metoda kojom se otkriva poremećaj agregacije trombocita istovremenim mjerenjem agregacije trombocita i izlučivanja ATP-a. Agregacija trombocita se određuje turbidimetrijskom metodom, dok se količina izlučenog ATP-a mjeri metodom luminiscencije korištenjem reagensa luciferin-luciferaze. Luciferin se dodaje u plazmu bogatu trombocitima, dok su trombociti inducirani agonistima. Intenzitet luminiscencije je razmjeran količini izlučenog ATP-a iz trombocita (Paniccia i sur., 2009).

1.6. Tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrometrijom masa

LC-MS igra važnu ulogu u detekciji lijekova i njihovih metabolita *in vivo* te terapijskog praćenja lijekova obuhvaćajući širok raspon bioloških molekula s visokom osjetljivosti, specifičnosti i točnosti.

Otopljeni uzorak nanosi se na kolonu za tekućinsku kromatografiju i odvaja na temelju različitog afiniteta za pokretnu i nepokretnu fazu. Izlaskom iz kolone, razdvojene komponente uzorka se usmjeravaju prema spekrometru masa.

Komponente uzroka podliježu elektrosprej ili kemijskoj ionizaciji atomosferskim tlakom te foto-ionizaciji atmosferskim tlakom. Spektrometar masa razdvaja nabijene čestice u plinovitoj fazi na temelju odnosa mase i naboja pod utjecajem električnog ili magnetskog polja.

Elektrosprej ionizacija (ESI) je učinkovita metoda za umjereno polarne molekule čime je omogućena analiza različitih metabolita, ksenobiotika i peptida, dok se neutralne molekule i molekule male polarnosti ne mogu učinkovito ionizirati. Kemijska ionizacija je pogodna za male, termički stabilne molekule. Foto-ionizacija atmosferskog tlaka je metoda koja se koristi za analizu neutralnih spojeva korištenjem fotona za ionizaciju molekula (Pitt, 2009).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kardiovasularne bolesti su na prvom mjestu uzroka smrti u svijetu. Smatra se da u prosjeku 17 milijuna ljudi godišnje u svijetu umire od nekog oblika kardiovaskularne bolesti, s time da se tri četvrtine smrtnih slučajeva odnosi na nerazvijene zemlje i 85% smrtnih slučajeva je uzrokovano srčanim i moždanim udarom.

Problem učinkovitosti, rezistencije i brojnih nuspojava acetilsalicilne kiseline te ozbiljne nuspojave i problem genetskog polimorfizma klopidogrela kao najčešće primjenjivanih lijekova u prevenciji kardiovaskularnih bolesti postali su sve naglašeniji. Nadalje, povećanjem udjela starije populacije, problem kardiovaskularnih bolesti je sve izraženiji, a pritisak na farmaceutsku industriju i potrebu za razvojem novih, učinkovitijih i sigurnijih lijekova sve veći. (www.who.int).

Različite studije su pokazale da polifenolni spojevi, kao sastavnice mnogih biljaka te flavonoidi izolirani iz vina i zelenog čaja pokazuju širok raspon blagotvornog utjecaja pa tako i antiagregacijski učinak.

Svrha ovog rada je odrediti minimalnu antiagregacijsku koncentraciju flavonoida kojom se postiže antiagregacijski učinak izabranih biljnih vrsta porodice Lamiaceae i identificirati sastavnice istraživanih biljaka te samim time istražiti njihov potencijalni klinički značaj.

Metoda kojom se određuje antiagregacijski učinak potaknut ADP-om je *in vitro* metoda impedancijske trombocitne agregometrije dok je za određivanje i identifikaciju sastavnica biljaka korištena LC-MS metoda.

Francuski paradoks

Visok unos zasićenih masti povezuje se s većom incidencijom kardiovasularnih bolesti i stopom smrtnosti. Termin francuskog paradoksa datira iz 1980ih i označava kontradikciju između znanstvene teorije i stvarnih činjenica. Stopa smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti je niža od očekivane unatoč konzumaciji hrane bogate zasićenim mastima i povećanim kolesterolom u usporedbi sa stopom smrtnosti pacijenata u ostalim zemljama gdje se stavlja naglasak na pravilniju prehranu. Unatoč nedostatku detaljnijih intervencijskih studija, proučavanje međukulturne i zemljopisne usporedbe, regionalne varijabilosti i životnih navika mogu barem djelomično objasniti francuski paradoks. Umjerena konzumacija kvalitetnog crnog vina

povećava koncentracije lipoproteina visoke gustoće (HDL), a smanjuje koncentraciju lipoproteina niske gustoće (LDL) i samim time reducira rizik kardiovaskularnih bolesti.

Istraživanja su pokazala da 20-30 grama vina dnevno smanjuje kardiovaskularni rizik za najmanje 40%. Polifenol resveratrol, kao glavna sastavnica grožđa, svojim antioksidativnim i protuupalnim djelovanjem smanjuje oksidativnu peroksidaciju regulirajući aktivnost endotelne NO sintaze zaslužne za stvaranje dušikovog oksida (NO). Dušikov oksid sprječava adheziju i agregaciju trombocita, adheziju i migraciju leukocita u arterijsku stijenku te inhibira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica koje su ključne komponente u razvoju ateroskleroze (Ferrières, 2004).

Azijski paradoks

Azijsku populaciju karakterizira niski rizik raka pluća i kardiovaskularnih bolesti unatoč činjenici da je potrošnja cigareta veća nego u većini drugih zemalja, s čak 31,3 milijuna teških pušača. (Kishore i sur., 2013).

Uzrok smanjene incidencije bolesti je posljedica velike dnevne konzumacije zelenog čaja, u prosjeku od 1,2 L dnevno. Najznačajnija sastavnica zelenog čaja u višoj koncentraciji je polifenol epigalokatehin-3-galat (Nugala i sur., 2012).

Istraživanjima je pokazano da postoji poveznica između konzumacije zelenog čaja sa smanjenom serumskom koncentracijom ukupnog kolesterola, LDL-a, triglicerida te povećanom koncentracijom HDL. Pokazano je da konzumacijom više od 1 šalice zelenog čaja dnevno na duži period dolazi do smanjenja rizika infarkta miokarda za 44%.

Epigalokatehin-3-galat može inhibirati faktore aktivacije trombocita i na taj način smanjiti »ljepljivost« i agregaciju trombocita. Nadalje, njegovo antioksidativno, protuupalno, protutumorsko djelovanje epigalokatehin galata ublažava rizik kardiovaskularnih bolesti uklanjanjem štetnih slobodnih radikala (Sumpio i sur., 2006).

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na zahtjev mag. pharm. Andree Antolić u sklopu doktorske disertacije. U istraživanju je sudjelovalo 20 zdravih dobrovoljaca uz potpisani informirani pristanak (Prilog).

3.1. Uzorci

Uzorci krvi

U radu je korištena puna krv zdravih dobrovoljaca koji nisu uzimali lijekove najmanje deset dana prije ispitivanja kako ne bi bilo dodatnih utjecaja na agregaciju trombocita. Uzorci krvi sakupljeni su u vakuum epruvete od 4,5 mL (Vacutainer BD, SAD). Po uzorku ispitivane biljke uzeta je krv troje dobrovoljaca u svrhu minimalizacije biološke varijabilnosti. Natrijev citrat je dodan u uzorke pune krvi prije ispitivanja kao antikoagulacijsko sredstvo za kompleksaciju kalcijevih iona važnih u agregaciji trombocita.

Ekstrakti biljaka porodice Lamiaceae

Ispitivani ekstrakti biljaka, pripremljeni prema propisu Europske farmakopeje, za određivanje minimalne antiagregacijske koncentracije prisutnih flavonoida su sljedeći:

- **Uzorak 1:** *Origanum vulgare* L., Lamiaceae - list, stabiljka i cvijet, ubran u farmaceutskom botaničkom vrtu *Fran Kušan*
- **Uzorak 2:** *Mentha x piperita* L., Lamiaceae - list, stabiljka, *Fran Kušan*
- **Uzorak 3:** *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae - list i cvijet, *Fran Kušan*
- **Uzorak 4:** *Ocimum basilicum* L., Lamiaceae - list i stabiljka, *Fran Kušan*
- **Uzorak 5:** *Lavandula angustifolia* L., Lamiaceae - list, cvijet i stabiljka, *Fran Kušan*
- **Uzorak 6:** *Calamintha sp.* L., Lamiaceae - list, stabiljka i cvijet, *Fran Kušan*
- **Uzorak 7:** *Lavandula angustifolia* L., Lamiaceae - stabiljka, list i cvijet, Orebić, Škvar
- **Uzorak 8:** *Lavandula sp.* L., Lamiaceae, hibrid, križanac, Orebić, Bilopolje
- **Uzorak 9:** *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae - bez cvijeta, Orebić, Škvar
- **Uzorak 10:** *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae - cvijet, stabiljka, list, Orebić, Bilopolje

3.2. Kemikalije

Kao induktor agregacije je korišten adenozin difosfat koncentracije 0,2 mM (Multiplate® ADPtest, Roche, Švicarska) dok su preostale kemikalije pribavljene od sljedećih dobavljača:

- aceton (Kemika, Hrvatska)
- acetonitril HPLC čistoće (Merck, Njemačka)
- adenozin difosfat (ADP), (Roche, Švicarska)
- dimetilsulfoksid (DMSO), (Sigma-Aldrich, Švicarska)
- etanol (Kemika, Hrvatska)
- etilacetat (Merck, Njemačka)
- fiziološka otopina s dodatkom kalcijeva klorida (0,003 M $CaCl_2$ u 0,9% NaCl), (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska)
- heksametilentetraamin (Fluka, Švicarska)
- kloridna kiselina 25% (Kemika, Hrvatska)
- mravlja kiselina HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, SAD)
- metanol HPLC čistoće (Merck, Njemačka)

3.2.1 Priprema uzoraka ispitivanih biljnih vrsta

Radne otopine biljnih vrsta priređene su ekstrakcijom 0,3 g usitnjenog biljnog materijala s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5%-tne vodene otopine heksametilentetraamina zagrijavanjem do vrenja 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni hidrolizat se propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu, a ostaci biljnog materijala se ponovno ekstrahiraju s 20 mL acetona grijanjem do vrenja 10 minuta. Zatim se otopina propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu i ponavlja se ekstrakcija acetonom. Sjedinjeni se filtrati razrjeđuju acetonom do 100,0 mL. Prenese se 50,0 mL acetonskog ekstrakta u okruglu tikvicu te upari do suha na rotacijskom vakuum uparivaču. Uparenom ostatku dodano je 5 mL DMSO te se priprema koncentracijski niz pripravljenih otopina.

3.3. Instrumenti i laboratorijski pribor

Laboratorijski pribor

- analitička vaga (Mettler-Toledo, SAD)
- detektor masa Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS s elektronsprej ionizacijskim sučeljem (Agilent, Njemačka)
- kolona za tekućinsku kromatografiju Poroshell 120 EC-C18 dimenzija 100 x 3,0 mm i promjera zrna punila 2,7 μm (Agilent, SAD)
- kolona za tekućinsku kromatografiju Zorbax SBC8 dimenzija 12,5 x 4,0 mm i promjera zrna punila 5μm (Agilent, SAD)
- laboratorijska vaga Mettler-Toledo AB135-S/FACT (Mettler-Toledo, SAD)
- tekućinski kromatograf Agilent 1200 RR s DAD detektorom (Agilent, Njemačka)

Impedancijski agregometar

Eksperimentalni dio mjerenja agregacije trombocita proveden je na Multiplate® Analyzer (Roche,Switzerland) instrumentu na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu (slika 5). Analizator se može koristiti u dijagnozi i terapijskom rješavanju problema pacijenata s poremećajima funkcije trombocita, preoperativno kao alat u predviđanju krvarenja pacijenta i za praćenje učinkovitosti antitrombocitne terapije pacijenta.

Postupak mjerenja je unaprijed određen prema generičkom postupku proizvođača instrumenta. Računalni program korisnika vodi kroz proces mjerenja i korištenje automatske pipete. Svi sastojci se dodaju automatskom pipetom u kivetu s dva para srebrnih elektroda i magnetskim mješačem obloženim teflonom te povezanih s računalom (www.diagnostics.roche.com).



Slika 5: Multiplate® Analyzer (Roche,Switzerland) za provedbu agregacije trombocita. Preuzeto iz www.diagnostics.roche.com

3.4. METODE

3.4.1. Metoda praćenja agregacije trombocita

Mjerenje agregacije trombocita provodi se u kiveti s dva para srebrnih elektroda i teflonom obloženim mješačem. Kiveta se stavlja u inkubacijski blok analizatora i elektrode se spajaju na instrument (slika 6A). U sljedećem koraku dolazi do dodavanja uzoraka krvi i reagensa automatskom pipetom te indukcije agregacije dodatkom induktora (slika 6B).

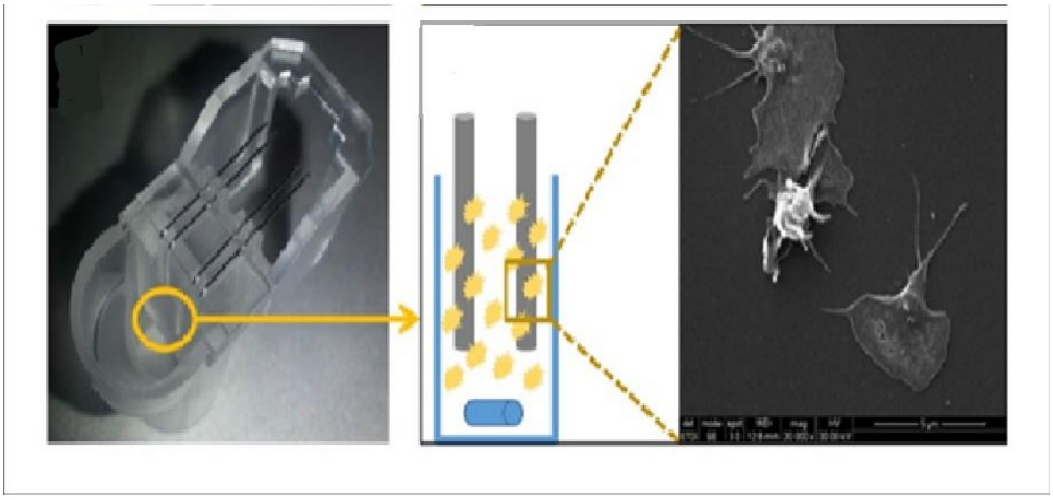


Slika 6A: Provedba testa agregacije: A) stavljanje kivete s dva para nezavisnih elektroda i magnetskim mješačem u inkubacijski blok analizatora i spajanje na instrument.
Preuzeto iz www.diapharma.com



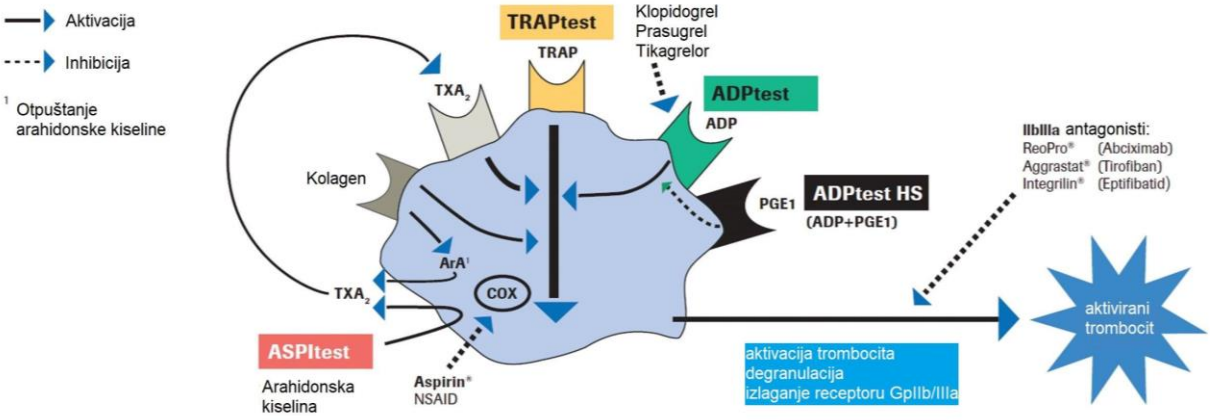
Slika 6B: Provedba testa agregacije: B) Stavljanje uzoraka krvi, reagensa i induktora agregacije automatskom pipetom u kivetu. Preuzeto iz www.diapharma.com

Trombociti u mirovanju neće stvarati ugrušak već ukoliko dođe do njihove aktivacije i adhezije na stijenke krvnih žila odnosno na površinu elektroda prilikom laboratorijskog ispitivanja. Dodatkom induktora aktivacije trombociti na svojim membranama prezentiraju adhezijske molekule, mijenjaju oblik i dolazi do njihovog međusobnog povezivanja i agregacije na površini elektroda (slika 7).



Slika 7: Prikaz agregiranih trombocita na elektrodama dodatkom induktora agregacije ADP-a i agregacije trombocita elektronskim mikroskopom. Preuzeto i prilagođeno prema www.researchgate.net

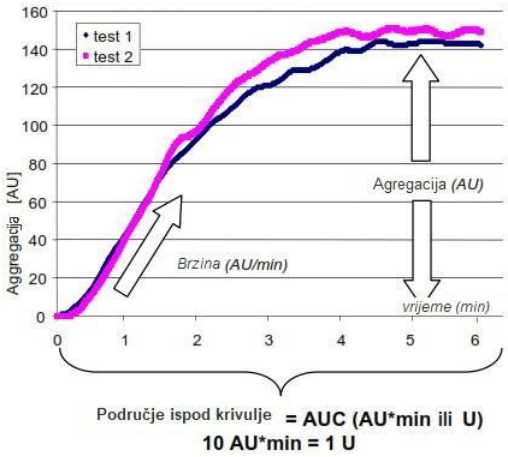
U ispitivanjima agregacije trombocita koriste se različiti induktori agregacije kao što su ADP, TRAP-6, arahidonska kiselina, kolagen i ristocetin. U ovom je ispitivanju korišten ADP test. Dodatkom ADP-a u uzorak krvi doći će do aktivacije trombocita putem ADP receptora, otpuštanja endogenog ADP iz granula trombocita te njihove ireverzibilne agregacije (Slika 8).



Slika 8: Prikaz procesa agregacije trombocita potaknuto različitim induktorima agregacije. Preuzeto i prilagođeno prema www.diagnostics.roche.com

Računalo prijanjanje trombocita na površinu elektroda bilježi kao grafički prikaz povećanja otpora u ovisnosti o vremenu. Za daljnju analizu se koristi izračunata površina ispod krivulje (AUC). Grafički prikaz ovisnosti agregacije trombocita o vremenu i površine ispod krivulje su prikazani na slici 9 (Calatzis i sur., 2007).

Korištenjem *Multiplate® Analyzer* uređaja omogućena je upotreba pune krvi čime se izbjegava oštećenje trombocita, potreba za dodatnom pripremom uzorka i centrifugiranja krvi. Potrebne su manje količine uzoraka te je moguće vršiti pet mjerenja agregacije istovremeno (Novaković, 2017).



Slika 9: Grafički prikaz ovisnosti agregacije trombocita na površinu elektroda (izraženo u arbitrarnim jedinicama, AU) o vremenu. Sveukupnu aktivnost trombocita najbolje prikazuje površina ispod krivulje (AUC, eng. *area under curve*).
(Preuzeto i prilagođeno prema Calatzis i sur., 2007)

Za sprječavanje koagulacije krvi dobrovoljaca prije ispitivanja uzorku pune krvi dodaje se antikoagulans natrijev citrat za kompleksaciju kalcijevih iona koji su važni za normalnu funkciju trombocita. Dodavanje fiziološke otopine s dodatkom $CaCl_2$ u kivetu za mjerenje osigurava dovoljnu razinu kalcijevih iona i nadilazi učinak citrata.

Prema generičkoj proceduri proizvođača instrumenta, u kivetu za mjerenje agregacije trombocita, automatskom pipetom dodaje se 300 µL fiziološke otopine $CaCl_2$. Zatim se doda 20 µL ekstrakta ispitivane biljke te 300 µL citratne krvi. Ispitivani uzorak se inkubira 3 minute na 37° C nakon čega se dodaje 20 µL induktora agregacije ADP-a.

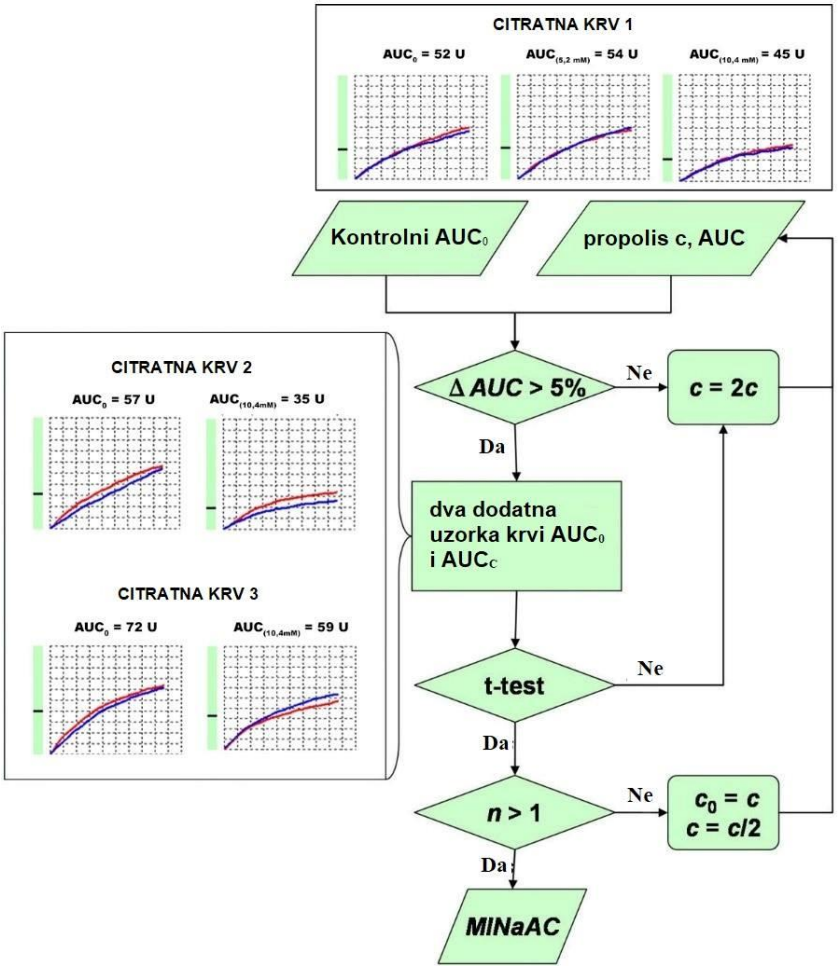
Sljedeća inkubacija traje 6 minuta i istovremeno se provodi mjerenje agregacije izražene kao površina ispod krivulje u arbitrarnim jedinicama na grafu ovisnosti agregacije o vremenu.

Umjesto ekstrakta ispitivane biljke, za negativnu kontrolu se dodaje isti volumen dimetilsulfoksida konačne koncentracije 3% u svim pokusima.

3.4.2. Određivanje minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida

Za svaki uzorak ispitivane biljke potrebno je izmjeriti agregaciju kontrolnog uzorka odnosno negativne kontrole (AUC_0, bez dodatka ekstrakta biljke; bez prisustva flavonoida) te uzorka s ekstraktom biljke (AUC).

U slučaju da je razlika u vrijednostima agregacije negativne kontrole i uzorka s ekstraktom biljke manja od 5% potrebno je udvostručiti koncentraciju flavonoida. Ako je razlika agregacija veća od 5%, potrebna su dva dodatna mjerenja na novim uzorcima citratne krvi (Bojić, 2012). Postupak je slikovito prikazan na slici 10.



Slika 10: Slikoviti prikaz određivanja minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida (MINaAC). Dva paralelna mjerenja istog uzorka predstavljena su plavom i crvenom linijom na grafu ovisnosti agregacije trombocita o vremenu (Bojić, 2012).

3.4.3. Kvalitativna analiza biljnih vrsta tekućinskom kromatografijom spregnutom sa spektrometrom masa (LC-MS)

LC-MS analiza provedena je na HPLC sustavu spregnutom s detektorom spektrometrije masa s kvadrupolnim analizatorom i analizatorom vremena leta (Q-TOF, engl. *quadrupol time-of-flight mass spectrometry detector*) koji koristi sučelje ionizacije elektroraspršenjem (ESI, engl. *electronspray ionization*). Separacija je postignuta na Poroshell 120 EC-C18 koloni s gradijentnim protokom mobilnih faza voda/metanol/mravlja kiselina 93:5:2 (A) i 3:95:2 (B) sljedećeg rasporeda: (*t*/min, %B): (0, 40), (14, 80), (15, 80), (16, 40), (20, 40). Protok mobilne faze iznosio je 400 μL/min, a volumen injektiranih uzoraka 5 μL. Odijeljene sastavnice detektirane su masenim detektorom nakon provedene ionizacije elektroraspršenjem. Protok dušika iznosio je 8 L/min, temperatura 300 ˚C. Sastavnice su određene na osnovi rezultata dobivenih za poredbene supstancije i literaturnih podataka.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati impedancijske agregometrije

Za svako mjerenje antiagregacijskog učinka razrijeđenih ekstrakata ispitivanih uzoraka izmjerena je i agregacija kontrolnog uzorka gdje se dodaje isti volumen DMSO umjesto određenog volumena ekstrakta ispitivane biljke. Za daljnju analizu koristile su se izmjerene površine ispod krivulje (AUC), dok je statistički značajno smanjenje agregacije uzorka (minimalna antiagregacijska koncentracija) odnosno razlika u postotku agregacije potvrđena Studentovim *t*-testom. Koncentracije ekstrakata biljaka izražene su u molarnim koncentracijama uzimajući u obzir molekulsku masu kvercetina (M_w = 302,236).

Dobiveni rezultati razrijeđenih ekstrakata ispitivanih biljaka i kontrolnog uzorka prikazani su tablično (tablica 2-11).

Tablica 2: Uzorak 1: *Origanum vulgare* L., Lamiaceae - list, stabiljka i cvijet, Fran Kušan

RAZRJEĐENJE	**10000**
AGREGACIJA KONTROLA	**47**
AGREGACIJA UZORKA	**35**
%AGREGACIJE	**74,47**
%DEVIJACIJE	**0,98**
%DEV. KONTROLA	**8,08**
ST. DEV. KONTROLA	**1,90**
ST. DEV. UZORAK	**0,17**
P	**0,0003**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,02**
MINaAC(µM)	**2,07**

Tablica 3: Uzorak 2: *Mentha x piperita* L., Lamiaceae -list, stabiljka, Fran Kušan

RAZRJEĐENJE	**1000**
AGREGACIJA KONTROLA	**76**
AGREGACIJA UZORKA	**47**
%AGREGACIJE	**61,84**
%DEVIJACIJE	**4,20**
%DEV .KONTROLA	**2,35**
ST. DEV. KONTROLA	**0,89**
ST. DEV. UZORAK	**0,99**
P	**0,0005**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,2**
MINaAC(μM)	**20,68**

Tablica 4: Uzorak 3: *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae - list i cvijet, Fran Kušan

RAZRJEĐENJE	**1000**
AGREGACIJA KONTROLA	**35**
AGREGACIJA UZORKA	**16**
%AGREGACIJE	**45,71**
%DEVIJACIJE	**12,17**
%DEV.KONTROLA	**10,92**
ST. DEV. KONTROLA	**1,91**
ST. DEV. UZORAK	**0,97**
P	**0,0023**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,2**
MINaAC(μM)	**20,68**

Tablica 5: Uzorak 4: *Ocimum basilicum* L., Lamiaceae - list i stabiljka, Fran Kušan

RAZRJEĐENJE	**100000**
AGREGACIJA KONTROLA	**96**
AGREGACIJA UZORKA	**94**
%AGREGACIJE	**97,92**
%DEVIJACIJE	**4,20**
%DEV.KONTROLA	**0,001**
ST. DEV. KONTROLA	**0,00048**
ST.DEV.UZORAK	**1,97**
P	**0,05**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,0002**
MINaAC(μM)	**0,02**

Tablica 6: Uzorak 5: *Lavandula angustifolia* L., Lamiaceae - list, cvijet i stabiljka, Fran Kušan

RAZRJEĐENJE	**10000**
AGREGACIJA KONTROLA	**64**
AGREGACIJA UZORKA	**46**
%AGREGACIJE	**71,88**
%DEVIJACIJE	**15,18**
%DEV.KONTROLA	**5,26**
ST.DEV.KONTROLA	**1,68**
ST.DEV.UZORAK	**3,49**
P	**0,0081**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,02**
MINaAC(μM)	**2,07**

Tablica 7: Uzorak 6: *Calaminha sp* L., Lamiaceae - list, stabiljka i cvijet, Fran Kušan

RAZRJEĐENJE	**10000**
AGREGACIJA KONTROLA	**96**
AGREGACIJA UZORKA	**62**
%AGREGACIJE	**64,58**
%DEVIJACIJE	**11,43**
%DEV. KONTROLA	**0,001**
ST. DEV. KONTROLA	**0,00048**
ST. DEV. UZORAK	**3,54**
P	**0,0001**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,02**
MINaAC(μM)	**2,07**

Tablica 8: Uzorak 7: *Lavandula angustifolia* L., Lamiaceae -stabiljka, list i cvijet, Orebić, Škvar

RAZRJEĐENJE	**1000**
AGREGACIJA KONTROLA	**61**
AGREGACIJA UZORKA	**40**
%AGREGACIJE	**65,57**
%DEVIJACIJE	**4,96**
%DEV.KONTROLA	**9,30**
ST. DEV. KONTROLA	**2,84**
ST. DEV. UZORAK	**0,99**
P	**0,0031**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,2**
MINaAC(μM)	**20,68**

Tablica 9: Uzorak 8: *Lavandula sp* L., Lamiaceae**,** hibrid, križanac, Orebić, Bilopolje

RAZRJEĐENJE	**100**
AGREGACIJA KONTROLA	**53**
AGREGACIJA UZORKA	**46**
%AGREGACIJE	**86,79**
%DEVIJACIJE	**3,97**
%DEV. KONTROLA	**14,21**
ST. DEV. KONTROLA	**3,76**
ST. DEV. UZORAK	**0,91**
P	**0,01**
KONCENTRACIJA (g/L)	**2,00**
MINaAC(µM)	**206,79**

Tablica 10: Uzorak 9: *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae - bez cvijeta, Orebić, Škvar

RAZRJEĐENJE	**1000**
AGREGACIJA KONTROLA	**46**
AGREGACIJA UZORKA	**45**
%AGREGACIJE	**97,83**
%DEVIJACIJE	**20,26**
%DEV.KONTROLA	**2,24**
ST. DEV. KONTROLA	**0,51**
ST. DEV. UZORAK	**4,56**
P	**0,0009**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,2**
MINaAC(µM)	**20,68**

Tablica 11: Uzorak 10: *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae - cvijet, stabiljka, list, Orebić, Bilopolje

RAZRJEĐENJE	**10000**
AGREGACIJA KONTROLA	**62**
AGREGACIJA UZORKA	**46**
%AGREGACIJE	**74,19**
%DEVIJACIJE	**16,83**
%DEV.KONTROLA	**4,88**
ST. DEV. KONTROLA	**1,51**
ST. DEV. UZORAK	**3,87**
P	**0,0106**
KONCENTRACIJA (g/L)	**0,02**
MINaAC(µM)	**2,07**

Raspon koncentracija razrijeđenih ekstrakata ispitivanih biljaka kretao se od 0,002 g/L – 0,2 g/L dok je raspon minimalnih antiagregacijskih koncentracija bio između 0,02 µM i 206,79 µM. Uspoređujući koncentraciju uzoraka biljaka i postotak agregacije, *Ocimum basilicum,* L., Lamiaceae je pokazao statistički najznačajniju agregaciju trombocita: 97,92% agregacije s MINaAC od 0,02 µM. Što je niža MINaAC to je antiagregacijski učinak veći.

4.2. Rezultati kvalitativne analize sastava ekstrakata biljnih vrsta

U svrhu identifikacije pojedinih sastavnica ispitivanih uzoraka ekstrakata biljaka s korištena je LC-MS analiza. Dobiveni rezultati su prikazani tablično (tablica 12-21).

Tablica 12: Uzorak 1: *Origanum vulgare* - list, stabiljka i cvijet, Fran Kušan

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_8O_4$	3,04	180,0422	Kavena kiselina
$C_9H_6O_3$	3,04	162,0314	Umbeliferon
$C_{18}H_{16}O_6$	12,67	328,0949	Salvigenin

Tablica 13: Uzorak 2: *Mentha x piperita* - list, stabiljka, Fran Kušan

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_{15}H_{10}O_6$	2,14	286,0477	Luteolin
$C_{11}H_{16}O_2$	2,16	180,1149	Kempferol
$C_9H_8O_4$	3,02	180,0422	Kavena kiselina
$C_9H_6O_3$	3,02	162,0314	Umbeliferon
$C_{15}H_{12}O_6$	4,11	288,0634	Eriodiktiol
$C_{18}H_{16}O_8$	7,66	360,0842	Ružmarinska kiselina
$C_{17}H_{14}O_6$	9,98	314,0789	Krizmaritin
$C_{18}H_{16}O_6$	12,68	328,0949	Salvigenin
$C_{20}H_{28}O_2$	15,26	300,209	Karnozinska kiselina

Tablica 14: Uzorak 3: *Rosmarinus officinalis* - list i cvijet, Fran Kušan

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_8O_4$	2,97	180,0422	Kavena kiselina
$C_9H_6O_3$	2,97	162,0314	Umbeliferon
$C_{20}H_{26}O_5$	7,26	346,1779	Epirozmanol
$C_{15}H_{10}O_5$	7,57	270,0529	Apigenin
$C_{16}H_{12}O_6$	7,85	300,0634	Diosmetin
$C_{20}H_{26}O_5$	8,2	346,1779	Rozmanol
$C_{17}H_{14}O_6$	9,97	314,0789	Krizmaritin
$C_{16}H_{12}O_5$	11,39	284,0685	Akacetin
$C_{18}H_{16}O_6$	12,67	328,0949	Salvigenin
$C_{21}H_{28}O_5$	13,57	360,1937	Epirozmanol metileter
$C_{20}H_{26}O_4$	14,7	330,1836	Karnozol
$C_{19}H_{26}O_3$	15,83	302,1882	5,6,7,10-tetrahidro-7-hidroksirozmarikinon

Tablica 15: Uzorak 4: *Ocimum basilicum* - list i stabiljka, Fran Kušan

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_6O_3$	2,99	162,0314	Umbeliferon
$C_9H_8O_4$	2,99	180,0422	Kavena kiselina

Tablica 16: Uzorak 5: *Lavandula angustifolia* - list, cvijet i stabiljka, Fran Kušan

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_6O_3$	2,99	162,0314	Umbeliferon
$C_{15}H_{10}O_5$	7,58	270,0529	Apigenin
$C_{17}H_{14}O_6$	9,97	314,0789	Krizmaritin
$C_{20}H_{26}O_4$	14,68	330,1836	Karnozol

Tablica 17: Uzorak 6: *Calamintha nepeta* - list, stabiljka i cvijet, Fran Kušan

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_8O_4$	3,02	180,0422	Kavena kiselina
$C_9H_6O_3$	3,02	162,0314	Umbeliferon
$C_{18}H_{16}O_8$	7,67	360,0842	Ružmarinska kiselina

Tablica 18: Uzorak 7*: Lavandula angustifolia* - stabiljka, list i cvijet, Orebić, Škvar

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_8O_4$	2,97	180,0422	Kavena kiselina
$C_9H_6O_3$	2,97	162,0314	Umbeliferon
$C_{20}H_{28}O_2$	15,28	300,2089	Karnozinska kiselina

Tablica 19: Uzorak 8: *Lavandula sp.* - hibrid, križanac, Orebić, Bilopolje

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_6O_3$	2,99	162,0314	Umbeliferon

Tablica 20: Uzorak 9*: Rosmarinus officinalis* - bez cvijeta, Orebić, Škvar

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_8O_4$	2,98	180,0422	Kavena kiselina
$C_9H_6O_3$	2,98	162,0314	Umbeliferon
$C_{20}H_{26}O_5$	7,27	346,1779	Epirozmanol
$C_{16}H_{12}O_6$	7,86	300,0634	Diosmetin
$C_{20}H_{26}O_5$	8,21	346,1779	Rozmanol
$C_{17}H_{14}O_6$	9,98	314,0789	Krizmaritin
$C_{16}H_{12}O_5$	11,4	284,0685	Akacetin
$C_{21}H_{28}O_5$	13,57	360,1937	Epirozmanol metil eter
$C_{19}H_{26}O_3$	15,84	302,1882	5,6,7,10tetrahidro-7-hidroksirozmarikinon

Tablica 21: Uzorak 10: *Rosmarinus officinalis* - cvijet, stabiljka, list, Orebić, Bilopolje

Kemijska formula	Vrijeme zadržavanja	Masa	Sastavnice
$C_9H_8O_4$	2,98	180,0422	Kavena kiselina
$C_9H_6O_3$	2,98	162,0314	Umbeliferon
$C_{15}H_{10}O_5$	7,59	270,0529	Apigenin
$C_{16}H_{12}O_6$	7,9	300,0634	Diosmetin
$C_{20}H_{26}O_5$	8,21	346,1779	Rozmanol
$C_{21}H_{28}O_5$	13,58	360,1937	Epirozmanol metil eter
$C_{20}H_{26}O_4$	14,7	330,1836	Karnozol

5. RASPRAVA

Kardiovaskularne bolesti su već dugi niz godina glavni uzrok smrtnosti. Postotak umrlih od srčanog, moždanog udara je sve više u porastu. Ljudima je dostupan širok raspon informacija, svjesniji su nuspojava postojeće terapije i često se okreću prirodnijim rješenjima; od običnog sirupa za kašalj pa sve do kompleksnijih bolesti. Pritisak na farmaceutsku industriju je samim time sve veći i stavlja se naglasak na istraživanja spojeva prirodnih izvora u svrhu prevencije i liječenja bolesti.

Od davnina su poznata ljekovita svojstva biljaka i brojnim istraživanjima je dokazana njihova dobrobit na zdravlje, od antioksidativnog, protuupalnog, antitumorskog, hepatoprotektivnog i drugog djelovanja.

Kako trombociti imaju ključnu ulogu u stvaranju ugruška, a poremećaji hemostaze mogu u konačnici dovesti i do smrti, cilj ovog rada je bio istražiti antiagregacijski učinak ispitivanih ekstrakata biljnih vrsta te njihov potencijalni klinički značaj u prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

Ispitivan je antiagregacijski učinak na deset uzoraka biljaka porodice Lamiaceae i na većem broju uzoraka krvi metodom impedancijske agregometrije prema generičkoj proceduri proizvođača instrumenta Multiplate® Analyzer.

Kao slabi induktor agregacije trombocita korišten je ADP. Primjenom jakog induktora agregacije poput kolagena ili TRAP-6 dobivaju se vrijednosti i do 2000 puta veće u odnosu na MINaAC flavonoida primjenom slabog agonista poput ADP-a.

Kao reprezentativni rezultati, prikazane su koncentracije razrijeđenih ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta, koje su pokazale statističku značajnost (vrijednost p). Raspon koncentracija ekstrakata kretao se od 0,002 g/L – 0,2 g/L dok je raspon minimalnih antiagregacijskih koncentracija bio između 0,02 μM za *Ocimum basilicum* i 206,79 μM za *Lavandula sp.* Što je niža vrijednost MINaAC to je antiagregacijski učinak veći.

Za kvalitativnu analizu korištena je LC-MS metoda. Usporedbom s literaturnim podacima, tablično su prikazane identificirane sastavnice flavonoida i fenolnih kiselina za svaku ispitivanu biljnu vrstu. Najveći broj identificiranih sastavnica je u ružmarinu: flavonoidi apigenin, diosmetin, krizmaritin, akacetin, salvigenin i terpenoidni derivati karnozola i rozmanola. Umbeliferon i kavena kiselina pokazale su se kao najčešće sastavnice svih ispitivanih biljnih vrsta.

5.1. Usporedna istraživanja

Za kavenu kiselinu, Lu i suradnici su 2015. god. pokazali da je je snažan inhibitor aktivacije trombocita djelujući na agregaciju trombocita, oslobađanje ATP, ekspresiju receptora i ostalih adhezivnih proteina *in vivo* i *in vitro* na mišjem modelu akutne tromboze. Kao najčešća sastavnica, prisutnost kavene kiseline objašnjava antiagregacijski učinak svih ispitivanih ekstrakata. Za vrstu *Lavandula sp.* je identificiran samo umbeliferon što bi donekle moglo objasniti najveću vrijednost MINaAC i samim time najmanji antiagregacijski učinak. Za usporedbu, Antolić i suradnici su 2017. dokazali sinergističko djelovanje sastavnica *Salvia sp.* na inhibiciju agregaciju trombocita što je bitna činjenica u usporedbi *in vivo* i *in vitro* uvjeta.

Novaković je u svom radu iz 2017. god. pokazao da ekstrakt matičnjaka (*Melissa officinalis* pokazuje antiagregacijski učinak te usporedbom koncentracije ekstrakata i standarda ružmarinske kiseline, kao najzastupljenije sastavnice, zaključio da je ružmarinska kiselina odgovorna za antiagregacijski učinak.

Bojić i suradnici su 2011. god. u svome znanstvenome radu dokazali antiagregacijski učinak niza flavonoida među kojima su bili akacetin, apigenin i diosmetin, identificirani i u ovome radu. Navarro-Núñez i sur. su 2009. god. pokazali da apigenin utječe na agregaciju trombocita interferirajući sa signalnim putevima u agregaciji trombocita.

Maleš i sur. su u svome radu objavljenom 2017.god. pokazali da brojni čimbenici poput mjesta uzgoja, vrste tla, dostupnih hranjivih tvari, količine sunca, utječu na razvoj biljke i samim time na sadržaj polifenola. Dokazali su statistički značajnu razliku u sadržaju flavonoida ekstrakata matičnjaka uzgojenih u Farmaceutskom botaničkom vrtu »Fran Kušan« i na području Našica, Novog Sada i Banja Luke u razdoblju od 2014.-2016. godine. Usporedno, postoji razlika u sadržaju ispitivane biljne vrste *Rosmarinus officinalis* ubrane u botaničkom vrtu »Fran Kušan«, u Orebiću i Bilopolju.

5.2. Prednosti i ograničenja istraživanja

Metoda impedancijske agregometrije nije zlatni standard u određivanju agregacije trombocita, ali je postupak brži, jednostavniji te nije potreban veliki volumen i dodatna obrada uzoraka krvi. Nadalje, barem deset dana prije, davatelji krvi nisu uzimali lijekove koji bi utjecali na agregaciju trombocita u svrhu smanjenja utjecaja na rezultate mjerenja. Uzimani su uzorci pune krvi kako bi se stvorili što sličniji *in vivo* uvjeti u *in vitro* postupku.

Iako neke sastavnice ne pokazuju značajan antiagregacijski učinak *in vitro* te unosom u organizam podliježu metaboličkim reakcijama, sinergističkim djelovanjem sastavnica bi se ipak mogao postići značajan antiagregacijski učinak te dovoljne koncentracije *in vivo.* Potrebna su daljnja ispitivanja i na većem broju uzoraka uzimajući u obzir različite čimbenike i prirodne faktore kako bi se postigli rezultati bitnog kliničkog značaja u prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

6. ZAKLJUČAK

Metoda impedancijske agregometrije se pokazala kao brza i jednostavna metoda simulirajući prirodni okoliš trombocita u određivanju agregacije. Iako se mogu koristiti različiti induktori agregacije, u ovom radu je korišten slabi induktor ADP.

U svrhu minimalizacije biološke varijabilnosti, rezultati su iskazani kao minimalna antiagregacijska koncentracija flavonoida koja pokazuje statistički značajnu agregaciju u odnosu na negativnu kontrolu.

LC-MS metodom su identificirane pojedine sastavnice deset uzoraka ispitivanih biljaka porodice Lamiaceae. Svi uzorci ekstrakata biljaka su pokazali antiagregacijski učinak s MINaAC od 0,02 μM za *Ocimum basilicum* do 206,79 μM za *Lavandula sp.*

Ograničenja korištenih metoda u istraživanjima, faktori prirodne varijabilnosti, promjenjiv sadržaj u razini spojeva prisutnih u biljkama samo su neki od čimbenika koji uporabu biljaka kao fitofarmaceutika još uvijek stavljaju u podređenu poziciju.

Problem kardiovaskularnih bolesti je sve izraženiji posebice s povećanjem udjela starije populacije, ali ono što se uloži u prevenciju to se višestruko vraća.

7. LITERATURA

Andrade M J, Faustino C, Garcia C, Ladeiras D, Reis P C, Rijo P. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA*, 2018, 4, FSO0283.

Antolić A, Maleš Ž, Tomičić M, Bojić M. The effect of Short-Toothed and Dalmatian Sage Extracts on Platelet Aggregation. *Food Technology & Biotehnology*, 2018, 2, 265-269.

Araniti F, Lupini A, Mercati F, Stati G. A, Abenavoli MR. *Calamintha nepeta* L. (Savi) as source of phytotoxic compounds: bio-guided fractionation in identifying biological active molecules. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 6, 1979-1988.

Bergovec M, Vražić H. Antiagregacijska terapija. *Medicus*, 2010, 19, 181-190.

Bojić M. Laboratorijsko ispitivanje i računalno simuliranje antiagregacijskog učinka polifenola, Farmaceutsko- biokemijski fakultet, Zagreb, 2012.

Calatzis A, Loreth RM, Spannagl M. Multiplate® platelet function analysis - application and interpretation. Munich: Dynabyte GmbH, 2007.

Ferrières J. The French paradox: lessons for other countries. *Heart*, 2004, 90, 107-111.

Gale JA. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicologic Pathology*, 2011, 39, 273-280.

Ghorbani A, Esmaeilizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2017, 7, 433-440.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija, 12. izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 2012.

Kishore J, Jena PK, Bandyopadhyay C, Swain M, Das S, Banerjee I. Hardcore smoking in three South-East Asian countries: results from the global adult tobacco survey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2013, 14, 625-30.

Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18, 1803.

Kumar S, Pandey K.A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 10, 1155.

Lu Y, Li Q, Liu YY, Sun K, Fan JY, Wang CS, Han JY. nhibitory effect of caffeic acid on ADP-induced thrombus formation and platelet activation involves mitogen-activated protein kinases. *Scientific reports*, 2015, 5, 13824.

Maleš Ž, Žunić K, Suban Jakuš V, Bojić M. Određivanje količine flavonoida u listovima matičnjaka – *Melissa officinalis* L., *Znanstveni radovi HFD,* 2017, 415-423.

Marković S. Fitoaromaterapija, Cedrus Centar, Zagreb, 2010.

Multiplate® Analyzer, 2019.
https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/multiplate-6-analyzer.html, pristupljeno 20. 1. 2019.

Navarro-Núñez L, Rivera J, Guerrero JA, Martinez C, Vicente V, Lozano ML. Differential effects of quercetin, apigenin and genistein on signalling pathways of protease-activated receptors PAR1 and PAR4 in platelets. *British Journal of Pharmacology,* 2009, 158, 1548-1556.

Nguyen A, Dasgupta A, Wahed A. Coagulation-Based Tests and Their Interpretation. *Science Direct,* 2016, 1, 1-16.

Novaković I. Određivanje antiagregacijskog učinka etanolnih ekstrakata lista matičnjaka. Diplomski rad, 2017.

Nugala B, Namasi A, Emmadi P, Kirshna PM. Role of green tea as an antioxidant in periodontal disease: The Asian paradox. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2012, 16, 313-216.

Oniga I, Puscas C, Silaghi-Dumitrescu R, Olah NK, Sevastre B, Marica R, Marcus I, Sevastre-Berghian AC, Benedec D, Pop CE, Hanganu D. *Origanum vulgare ssp*. vulgare: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules, 2018*, 23, 2077.

Opara El, Chohan M. Culinary Herbs and Spices: Their Bioactive Properties, the Contribution of Polyphenols and the Challenges in Deducing Their True Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15, 19183-19202.

Panche N. A, Diwan D. A, Chandra R.S. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016, 5, 47.

Paniccia R, Antonucci E, Maggini N, Romano E, Gori AM, Marucci R, Prisco D, Abbate R. Assessment of Platelet Function on Whole Blood by Multiple Electrode Aggregometry in High-

Risk Patients With Coronary Artery Disease Receiving Antiplatelet Therapy. *American Journal of Clinical Pathology*, 2009, 6, 834-842.

Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2009, 30, 19-34.

Phat L Tran. Figure 1, https://www.researchgate.net/figure/Multiplate-Analyzer-Impedance-Aggregometry-A-Multiplate-Analyzer-console-B-Example-of_fig1_284276154, pristupljeno 20. 4. 2019.

Schaffner W, Häfelfinger B, Ernst B. Ljekovito bilje, Kompendij. Leo-commerce, Rijeka, 1999.

Soheili M, Salami M. Lavandula angustifolia biological characteristics: An *in vitro* study. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 10, 1002.

State of Health in the EU Hrvatska, Pregled stanja zdravlja i zdravstvene zaštite 2017., https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/state/docs/chp_hr_english.pdf,

pristupljeno 8. 1. 2019.

Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel, DW, Qin F, Chen QH. Green Tea, the "Asian Paradox," and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Surgeons*, 2006, 5, 813-825.

Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutritients*, 2010, 2, 1231-1246

World health organization. Cardiovascular disease (CVDs), 2017., https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds), pristupljeno 8. 1. 2019.

8. SAŽETAK / SUMMARY

Zbog brojnih nuspojava postojeće terapije u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i sve većeg broja smrtnosti od srčanog i moždanog udara u razvijenim zemljama, teži se pronalasku učinkovitijih i sigurnijih lijekova. Od samih početaka, ljudi su se okretali prirodi u potrazi za rješenjima. Brojna istraživanja su pokazala da spojevi izolirani iz prirodnih izvora poput polifenola pokazaju značajnu dobrobit za zdravlje pa tako i antiagregacijski učinak kao bitnu poveznicu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Trombociti imaju glavnu ulogu u hemostazi i trombozi.

Metodom impedancijske agregometrije, prema generičkoj proceduri proizvođača instrumenta Multiplate® Analyzer, ispitivan je antiagregacijski učinak na deset uzoraka ekstrakata ispitivanih biljaka porodice Lamiaceae uz ADP kao induktora agregacije. Rezultati su iskazani kao minimalna antiagregacijska koncentracija (MINaAC) koja statistički značajno smanjuje agregaciju u odnosu na negativnu kontrolu. Za dokazivanje pojedinih sastavnica ekstrakata biljaka korištena je LC-MS metoda.

Vrijednosti MINaAC kretale su se između 0,02 µM za *Ocimum basilicum* do 206,79 µM za *Lavandula sp. Ocimum basilicum* je pokazao najjači antiagregacijski učinak.

Biljni ekstrakti bogati polifenolima koji pokazuju antiagregacijski učinak mogli bi doprinijeti prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

Due to the various side effects of the existing therapy in the prevention of cardiovascular diseases and the increasing number of deaths from cardiac arrest and stroke in developed countries, the goal is to find safer and more effective therapy. From the very beginning, people turned to nature in order to find solution for health issues. Numerous studies have shown that compounds isolated from natural sources, such as polyphenols, show significant health benefits and thus anti-aggregation effect as an essential link in the prevention of cardiovascular diseases. Thrombocytes play a major role in hemostasis and thrombosis.

By the method of impedance agregometry, according to the generic procedure of the producer of the Multiplate® analyzer instrument, the antiaggregation effect was investigated on ten samples of Lamiaceae family tested extracts with ADP as the inductance aggregator. The results are shown as the minimum anti-aggregation concentration (MINaAC), which statistically significantly reduces aggregation. The LC-MS method was used to identify the plant extracts components.

MINaAC values ranged between 0,02 μM for *Ocimum basilicum* to 206,79 μM for *Lavandula sp*. The final results showed that *Ocimum basilicum* had the strongest anti-aggregation effect.

Plant extracts rich in polyphenols that show antiaggregating properties could be used in prevention of cardiovascular diseases.

9. PRILOG

9.1 Informirani pristanak

„Antiagregacijski učinak propolisa i odabranih biljnih vrsta iz porodice Lamiaceae“

Glavni istraživači/mentori:
Doc. dr. sc. Mirza Bojić, Zavod za farmaceutsku kemiju, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Prof. dr. sc. Željan Maleš, Zavod za farmaceutsku botaniku, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Kandidat na doktorskom radu:
Andrea Antolić, mag. pharm., univ. mag. pharm.
ZU Ljekarne Švaljek
Kralja Tomislava 24, 49 246 Marija Bistrica
E-adresa: aantolic1@gmail.com

Poštovani dobrovoljni davatelji krvi,

Prije pristanka na sudjelovanje u ovom istraživanju važno je da pažljivo pročitate ovaj informirani pristanak koji sadrži sve informacije bitne za Vašu odluku o sudjelovanju u ovom istraživanju. Nakon što pročitate informirani pristanak, sva svoja pitanja možete postaviti liječniku ili osoblju koje sudjeluje u istraživanju. Posebno je važno da ispitivača obavijestite o svojim prošlim bolestima ili lijekovima koje uzimate.

1. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Trombociti sudjeluju u stvaranju hemostatskog ugruška na mjestu ozlijede krvne žile, ali mogu sudjelovati i u patološkim procesima – trombozama koje mogu dovesti do srčanog udara, moždanog udara ili periferne duboke venske tromboze te plućne embolije. Vodeći uzročnici smrtnosti u razvijenim zemljama upravo su krvožilne bolesti, stoga se stalno traga za novim antiagregacijskim lijekovima. Najčešće primjenjivani lijekovi u prevenciji krvožilnih bolesti su acetilsalicilna kiselina i klopidogrel. Acetilsalicilna kiselina je ireverzibilni inhibitor enzima ciklooksigenaza 1, dok je klopidogrel ireverzibilni inhibitor $P2Y_{12}$ receptora za adenozin-difosfat. Glavni nedostatak ovih lijekova je njihovo nakupljanje unutar trombocita stoga se samo prestankom uzimanja ovih lijekova ne može uspostaviti funkcija trombocita uslijed krvarenja. Od izoliranih prirodnih spojeva, antiagregacijsko djelovanje pokazuju polifenoli, prvenstveno flavonoidi i prirodni izvori bogati polifenolima poput propolisa te biljnih vrsta poput matičnjaka, kadulje, lavande, ružmarina, paprene metvice i bosiljka.

Cilj istraživanja, za koje će se koristiti Vaša krvi (4,5 mL citratne krvi), jest ispitivanje antiagregacijskog djelovanja potencijalnih novih farmakološki aktivnih spojeva

2. OPIS ISTRAŽIVANJA

2.1. Tip istraživanja

Istraživanje će se provesti u laboratoriju na uzorcima krvne plazme dobrovoljnih davatelja krvi. Za potrebe istraživanja koristit će se uzorci krvi preostali nakon neophodne rutinske laboratorijske dijagnostike. Uzorci krvi za standardna laboratorijska ispitivanja će se prikupljati i obrađivati pod izravnim nadzorom prim. dr. sc. Maje Tomičić, dr. med., spec. transfuziolog, voditeljice Odjela za trombocitnu i leukocitnu dijagnostiku i hemostazu.

2.2. Tijek istraživanja

Vaša suradnja i uključivanje u ovo istraživanje će nam omogućiti da ispitamo antiagregacijskog učinka propolisa i određenih biljnih vrsta te dođemo do novih potencijalnih farmakološki aktivnih spojeva.

Vi ćete biti uključeni u istraživanje na način da će se od Vas, uz dobrovoljnu darovanu krv, prikupiti i uzorci krvi u jednu epruvetu zapremnine 5 mL (4,5 mL krvi + 0,5 mL natrijeva citrata) koja će se, uz standardna krvna ispitivanja, koristiti i za gore navedeno istraživanje. Napominjemo da se **neće uzimati dodatni uzorci krvi**, već će se koristiti isti uzorci koji se inače koriste za rutinsku laboratorijsku analizu darovane krvi.

3. MOGUĆE NEGATIVNE POSLJEDICE ISTRAŽIVANJA

U odnosu na uobičajeno davanje krvi, **nema nikakvih dodatnih potencijalnih rizika** jer će se sva ispitivanja vršiti u standardnom uzorku darovane krvi.

4. MOGUĆA KORIST ISTRAŽIVANJA

Ispitivanje antiagregacijskog učinka ispitivanih spojeva može utjecati na razvijanje novih potencijalnih farmakološki aktivnih spojeva.

5. NAKNADE

Na Vama je da odlučite želite li sudjelovati ili ne.
Ako odlučite sudjelovati nećete dobiti nikakvu naknadu.

6. TAJNOST PODATAKA

Svi Vaši osobni podaci će biti pohranjeni i obrađivani uz najveću moguću diskreciju i zaštitu osobnosti i privatnosti u elektroničkom obliku. Glavni istaživač i njegovi suradnici pridržavat će se interne procedure za zaštitu osobnih podataka. U okviru istraživanja ili objavljivanja njegovih rezultata Vaše ime neće biti objavljeno. Izuzetak je moguć samo na Vaš zahtjev, a glavni istraživač i njegovi suradnici su dužni u potpunosti poštivati propisane postupke za zaštitu osobnih podataka. Uspostava naše baze podataka biti će organizirana prema inicijalima imena i prezimena i pomoću posebnog koda. Vašu medicinsku dokumentaciju moći će pregledavati samo glavni istraživač i njegovi suradnici, a Vaše ime nikada neće biti otkriveno trećim osobama. Pristup Vašoj dokumentaciji mogu imati predstavnici Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog

fakulteta, koje je odgovorno za odobravanje i nadzor nad provođenjem ovog znanstvenog istraživanja.

7. PUBLICIRANJE REZULTATA

Rezultati istraživanja bit će prezentirani na javnim skupovima, kao primjerice kongresima i seminarima, te mogu biti publicirani u znanstvenim ili promotivnim časopisima. U svakom slučaju, Vaš identitet bit će zadržan u tajnosti. Ako osim skupnih podataka budu objavljeni i pojedinačni podaci, koristit će se identifikacijski brojevi kako bi identitet sudionika ostao tajan, odnosno nedostupan javnosti.

8. SUDJELOVANJE U ISTRAŽIVANJU I IZLAZAK

Sudjelovanje u istraživanju je dobrovoljno. U bilo kojem trenutku možete prestati sudjelovati u istraživanju bez ikakvih štetnih posljedica.

9. OSOBA ZA KONTAKT

Kao sudionik istraživanja imate pravo na informacije o istraživanju. Možete pitati u vezi istraživanja bilo kada tijekom sudjelovanja u istraživanju. Bit ćete upoznati s novim značajnim rezultatima koji bi mogli utjecati na Vašu sigurnost ili odluku o daljnjem sudjelovanju u istraživanju.

Ukoliko imate bilo kakvih pitanja slobodno nazovite glavnog istraživača dr. sc. Mirza Bojić, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, mob. 099/ 676 1379, e-adresa: mbojic@pharma.hr ili kandidata Andrea Antolić, mag. pharm., univ. mag. pharm. koji sudjeluje u provođenju projekta u svrhu izrade svog doktorskog rada, mob. 099 690 3401, e-adresa: aantolic1@gmail.com.

INFORMIRANI PRISTANAK

Potvrđujem da sam imao/la dovoljno vremena da pročitam i razumijem protokol istraživanja, te da sam dobio/la zadovoljavajuće odgovore na sva postavljena pitanja.

Potvrđujem da sam u potpunosti informiran/a o:

(1) Svrsi istraživanja;
(2) Opisu istraživanja;
(3) Mogućim negativnim posljedicama;
(4) Mogućim koristima istraživanja;
(5) Naknadama;
(6) Tajnosti podataka;
(7) Publiciranju rezultata;
(8) Sudjelovanju u istraživanju i izlasku;
(9) Osobama za kontakt.

Pristankom na sudjelovanje u istraživanju također potvrđujem da razumijem da time nisam zakinut za svoja prava u sustavu osnovnoga zdravstvenog osiguranja.

Vlastoručnim potpisom potvrđujem dobrovoljno sudjelovanje u istraživanju.

_____
(ime i prezime dobrovoljnog davatelja krvi)

_____ _____
(potpis dobrovoljnog davatelja krvi) (datum)

_____
(ime i prezime osobe koja vodi
razgovor u vezi Inform. pristanka)

_____ _____
(potpis osobe koja vodi (datum)
razgovor u vezi Inform. pristanka)

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utjecaj začinskog bilja porodice Lamiaceae na agregaciju trombocita

Vanessa Bobetić

SAŽETAK

Zbog brojnih nuspojava postojeće terapije u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i sve većeg broja smrtnosti od srčanog i moždanog udara u razvijenim zemljama, teži se pronalasku učinkovitijih i sigurnijih lijekova. Od samih početaka, ljudi su se okretali prirodi u potrazi za rješenjima. Brojna istraživanja su pokazala da spojevi izolirani iz prirodnih izvora poput polifenola pokazaju značajnu dobrobit za zdravlje pa tako i antiagregacijski učinak kao bitnu poveznicu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Trombociti imaju glavnu ulogu u hemostazi i trombozi.
Metodom impedancijske agregometrije, prema generičkoj proceduri proizvođača instrumenta Multiplate® Analyzer, ispitivan je antiagregacijski učinak na deset uzoraka ekstrakata ispitivanih biljaka porodice Lamiaceae uz ADP kao induktora agregacije. Rezultati su iskazani kao minimalna antiagregacijska koncentracija (MINaAC) koja statistički značajno smanjuje agregaciju u odnosu na negativnu kontrolu. Za dokazivanje pojedinih sastavnica ekstrakata biljaka korištena je LC-MS metoda.
Vrijednosti MINaAC kretale su se između 0,02 μM za *Ocimum basilicum* do 206,79 μM za *Lavandula sp*. *Ocimum basilicum* je pokazao najjači antiagregacijski učinak.
Biljni ekstrakti bogati polifenolima koji pokazuju antiagregacijski učinak mogli bi doprinijeti prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 60 stranica, 10 slika, 21 tablica i 34 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Polifenoli; agregacija trombocita; Lamiaceae; LC-MS

Mentor: **Doc. dr. sc. Mirza Bojić,** *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Hrvoje Rimac**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Doc. dr. sc. Mirela Matić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Anita Somborac Bačura, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia
ili druga adresa

Diploma thesis

The effect of herb species of Lamiaceae family on platelet aggregation

Vanessa Bobetić

SUMMARY

Due to the various side effects of the existing therapy in the prevention of cardiovascular diseases and the increasing number of deaths from cardiac arrest and stroke in developed countries, the goal is to find safer and more effective therapy. From the very beginning, people turned to nature in order to find solution for health issues. Numerous studies have shown that compounds isolated from natural sources, such as polyphenols, show significant health benefits and thus anti-aggregation effect as an essential link in the prevention of cardiovascular diseases. Thrombocytes play a major role in hemostasis and thrombosis.

By the method of impedance agregometry, according to the generic procedure of the producer of the Multiplate® analyzer instrument, the antiaggregation effect was investigated on ten samples of Lamiaceae family tested extracts with ADP as the inductance aggregator. The results are shown as the minimum anti-aggregation concentration (MINaAC), which statistically significantly reduces aggregation. The LC-MS method was used to identify the plant extracts components.

MINaAC values ranged between 0,02 μM for *Ocimum basilicum* to 206,79 μM for *Lavandula sp*. The final results showed that *Ocimum basilicum* had the strongest anti-aggregation effect.

Plant extracts rich in polyphenols that show antiaggregating properties could be used in prevention of cardiovascular diseases.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 60 pages, 10 figures, 21 tables and 34 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Polyphenols; aggregation; Lamiaceae; LC-MS

Mentor: **Mirza Bojić**, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Hrvoje Rimac**, **Ph.D.** *Postdoktorand,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mirela Matić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Somborac Bačura Ph.D. *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2019.