

Određivanje količine flavonoida i fenolnih kiselina te antiagregacijskog učinka u vrstama *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L. i *Rosmarinus officinalis* L.

Marelja, Franjo Josip

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:731784>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Franjo Josip Marelja

**Određivanje količine flavonoida i fenolnih
kiselina te antiagregacijskog učinka u vrstama
Mentha x piperita L., *Origanum vulgare* L. i
Rosmarinus officinalis L.**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na predmetu Farmaceutska botanika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku botaniku i Zavodu za farmaceutsku kemiju, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Željana Maleša i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Mirze Bojića.

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Željenu Malešu i komentoru doc. dr. sc. Mirzi Bojiću na stručnom vodstvu, savjetima i strpljenju pri izradi diplomskog rada. Također zahvaljujem na nesebičnoj pomoći Andrei Antolić, mag. pharm., univ. mag. pharm., unutar čije je doktorske disertacije izveden ovaj diplomski rad te tehničkoj suradnici Ljiljani Jurkin sa Zavoda za farmaceutsku kemiju i kolegi Marku Parlovu na suradnji tijekom izrade ovog rada.

Nadalje, želim zahvaliti svojim brojnim prijateljima, kolegama i suigračima, a naročito Ivanu, Juraju, Vanji, Miji, Lani, Toniju i Anti te svojoj djevojci Nikolini na nesebičnoj podršci tijekom studiranja, a i u raznim drugim situacijama.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojoj najužoj obitelji te im time želim zahvaliti na konstruktivnoj potpori i ukazivanju na pravi put tijekom cijelog života, bez obzira na situaciju u kojoj se nalazili. Bez njih, mnogi uspjesi, akademski i neakademski, ne bi bili ostvareni. Veliko im hvala!

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. BOTANIČKI PREGLED	2
1.1.1. Svojstva biljaka porodice Lamiaceae (Labiatae)	2
1.1.2. Obilježja biljnih vrsta: <i>Mentha x piperita</i> L., <i>Origanum vulgare</i> L. i <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	3
1.1.2.1. <i>Mentha x piperita</i> L.	3
1.1.2.2. <i>Origanum vulgare</i> L.	4
1.1.2.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	5
1.2. KEMIJSKI SASTAV BILJNIH DROGA	6
1.2.1. <i>Menthae piperitae folium</i>	6
1.2.2. <i>Origani herba</i>	7
1.2.3. <i>Rosmarini folium</i>	8
1.3. FARMAKOLOŠKI UČINCI I UPORABA BILJNIH DROGA	9
1.3.1. <i>Menthae piperitae folium</i>	9
1.3.2. <i>Origani herba</i>	10
1.3.3. <i>Rosmarini folium</i>	11
1.4. FENOLNI SPOJEVI U BILJKAMA	13
1.4.1. Flavonoidi	14
1.4.2. Fenolne kiseline	17
1.5. ANTIAGREGACIJSKO DJELOVANJE	21
2. OBRAZLOŽENJE TEME	24
3. MATERIJALI I METODE	25
3.1. BILJNI MATERIJALI	25
3.2. APARATURA I KEMIJSKE TVARI	26
3.3. PRIPREMA RADNIH OTOPINA	27
3.4. UZORCI	28
3.5. METODE ISTRAŽIVANJA	28
3.5.1. Identifikacija biljnog materijala	28
3.5.2. Određivanje količine flavonoida	28
3.5.3. Određivanje količine fenolnih kiselina	29

3.5.4. Impedancijska agregometrija	30
3.5.5. Određivanje statistički značajne antiagregacijske koncentracije	31
4. REZULTATI	34
4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA	34
4.2. ANTIAGREGACIJSKI UČINAK EKSTRAKATA BILJNIH VRSTA	37
5. RASPRAVA	40
6. ZAKLJUČCI	42
7. LITERATURA	43
8. SAŽETAK/SUMMARY	46
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

O važnosti biljaka nije potrebno mnogo govoriti. Uz to što predstavljaju primaran izvor hranjivih tvari i proizvode kisik, izrazito su važne u liječenju raznih bolesti. Najstariji medicinski zapisi, govore o upotrebi biljaka u ljekovite svrhe. Razvojem medicine i suvremenih kemijskih lijekova sredinom prošlog stoljeća, liječenje biljkama je palo u drugi plan. Kemijski spojevi su pokazali snažnije djelovanje te su u brojnim slučajevima bili znatno korisniji od samih biljaka. Stoga se današnja medicina orijentirala više k takvom pristupu, a biljke su se poglavito zadržale u nekim, za zapadnu civilizaciju, alternativnim medicinskim pravcima.

No, zbog neučinkovitosti ili štetnosti pojedinih suvremenih lijekova, krenulo se tragati za novim terapijskim mogućnostima. Posljedično se javljaju različiti načini liječenja, a u jedan od zastupljenijih svakako spada sve popularniji povratak korištenju biljaka. Velika prednost njihove uporabe je u tome što su biljke, za razliku od kemijskih spojeva, prirodne te ih stoga ljudi smatraju sigurnijima, što ne mora uvijek biti istinito. Biljni pripravci također mogu imati neželjene i štetne učinke te stupati u interakcije s lijekovima, jer iako su prirodni, sadrže aktivne sastavnice kao i klasični lijekovi.

Biljne vrste, koje su predmet istraživanja ovog rada *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L., i *Rosmarinus officinalis* L. pripadaju hrvatskoj flori te se stoljećima primjenjuju u liječenju ili ublažavanju različitih stanja, od probavnih tegoba, do glavobolja. Uz to, poznato su začinsko bilje, vrlo ugodnih aromatičnih organoleptičkih svojstava, svakodnevno upotrebljavane u kulinarstvu. Za poneke je otkriveno da imaju pozitivne učinke na srčano – žilni sustav i potencijalno antiagregacijsko djelovanje, odnosno sprječavanje nakupljanja krvnih pločica koje su neophodne za nastanak krvnih ugrušaka, na čemu je glavni naglasak u ovom istraživanju.

1.1. BOTANIČKI PREGLED

1.1.1. Svojstva biljaka porodice Lamiaceae (Labiatae)

Porodica Lamiaceae, nekoć zvana Labiatae, a u hrvatskom prijevodu usnače, odnosno usnatice, prema najnovijim podacima obuhvaća više od 7000 biljnih vrsta podijeljenih u 236 rodova (www.britannica.com). Rasprostranjene su po cijelom svijetu, naročito u području Sredozemlja i zapadne Azije, a danas se mnoge i uzgajaju, što zbog svog lijepog izgleda i mirisa, što zbog svojih aromatičnih te ljekovitih svojstava. Radi se o zeljastim biljkama, trajnicama ili grmovima s karakterističnom četverobridnom stabljikom, križasto nasuprotnim listovima, bez palistića i cvjetovima složenim u pršljenaste cvatove koji se nalaze u pazušcima listova. Porodica usnača je dobila ime po obliku cvijeta. Naime, pet latica je sraslo u cijev koja je na kraju proširena i razdijeljena na dvije usne, gornja usna se sastoji od dvije, a donja od tri latice. Cvjetovi su dvospolni. Najčešće sadrže četiri prašnika, ponekad dva, a plodnica je nadržala, četverogradna s jednim sjemenim zametkom u svakom pretincu. Plod je cjepavac, koji se raspada na četiri suha, a ponekad mesnata plodića (Domac, 2002; Grlić, 1986).

Za biljke ove porodice svojstveno je da sadrže eterično ulje koje im daje ugodan aromatičan miris te je zaslužno za većinu njihovih ljekovitih djelovanja, a i upotrebu u kulinarstvu. Eterično ulje se nalazi uglavnom u žljezdastim dlakama koje su zastupljene na površini stabljike, listova i cvjetova te u žlijezdama. Kao što je već spomenuto, brojne biljne vrste porodice usnača se koriste kao mirodije i začini, pojedine vrste s manje intenzivnim mirisom se mogu jesti kao povrće, a također se uzgajaju kao ukrasno bilje ili za potrebe proizvodnje parfema. Stoga, radi se o biljkama s izrazitom industrijskom primjenom (Grlić, 1986).

1.1.2. Obilježja biljnih vrsta: *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L., i *Rosmarinus officinalis officinalis* L.

1.1.2.1. *Mentha x piperita* L.

M. x piperita, odnosno paprena metvica je križanac dviju srodnih vrsta, vodene metvice (*M. aquatica* L.) i klasaste metvice (*M. spicata* L.) (Toplak Galle, 2005). Ne raste samoniklo, već samo kao kultivirana biljka u područjima s umjerenom, ali ne presuhom klimom, na laganom pjeskovitom tlu. Udomaćena je u Europi, Aziji, Sjevernoj i Južnoj Americi, a ponajviše se može pronaći u Engleskoj, Francuskoj, Italiji te Sjedinjenim Američkim Državama. Uzgaja se kao jednogodišnja ili dvogodišnja kultura, vegetativno pomoću mnogobrojnih vriježa koje izbijaju iz podzemnih dijelova (Kuštrak, 2005). Potrebno ju je svake druge godine presađivati, jer se u prirodi križanjem izgube prvobitna svojstva (Pahlow, 1989).

Radi se o višegodišnjoj, 50 do 80 centimetara visokoj zeljastoj biljci, četverobridne razgranate stabljike tamnoljubičaste boje, s nasuprotno raspoređenim, jajasto kopljastim, zašiljenim, pilasto nazubljenim, 4 do 7 centimetara dugim listovima s modrim žilama. Cvjetovi su ljubičaste ili rijetko bijele boje, izrastaju iz koljenaca kao pršljenovi te tvore klasu slične cvatove (Slika 1.). Cvate u ljetnim mjesecima, a skuplja se neposredno prije cvatnje zbog najvećeg sadržaja eteričnog ulja koje daje biljci prepoznatljiv miris te je ujedno najčešći cilj njezina uzgoja. Upotrebljavaju se listovi, ali i mladice s cvjetnim vršcima, a biljna droga se naziva *Menthae piperitae folium* (Gursky, 1999).



Slika 1. *Mentha x piperita* L. (www.plantea.com.hr)

1.1.2.2. *Origanum vulgare* L.

Mravinac raste na suhim livadama i u svijetlijim šumama, šikarama i živicama, odnosno prisojnoj strani padina, u brdovitim krajevima pokraj puteva čak i na nadmorskim visinama do 1800 metara. Odgovara mu hranjivo i vapnenasto tlo. Rasprostranjen je u velikom dijelu Europe i Azije pa tako i u Hrvatskoj gdje se može naći u Zagorju, Žumberačkom gorju, Slavoniji i Dalmaciji (Kuštrak, 2005; Grlić, 1986). Skupljaju se cijeli nadzemni dijelovi u vrijeme cvatnje od lipnja do rujna, od čega su stabljike neupotrebljive pa se uklanjaju nakon sušenja. Za skupljanje se odabiru sunčani predjeli i gornji dijelovi biljke, zbog većeg sadržaja eteričnog ulja koje se može procijeniti mirisanjem biljke (Toplak Galle, 2005; Pahlow, 1989).

Vrsta *O. vulgare* je zeljasta trajnica, visoka 30 do 60 centimetara s četverobridnom, uspravnom, razgranatom stabljikom koja je na površini crvenkasto obojena, nasuprotnih, jajolikih, šiljastih, 2 do 3 centimetra dugih listova s kratkom peteljkom, cjelovita ruba, koji su pri dnu stabljike veći. Ima sitne ljubičasto do ružičaste cvjetove koji se nalaze na vrhovima ogranaka u metličastim cvatovima (Slika 2.) (Kuštrak, 2005).



Slika 2. *Origanum vulgare* L. (www.plantea.com.hr)

1.1.2.3. *Rosmarinus officinalis* L.

Naziv roda *Rosmarinus* potječe od latinskog izraza „*ros marinus*“ što znači morska rosa. Vrsta *R. officinalis* raste samoniklo na sunčanim, kamenitim područjima, u makiji Mediterana, a često se koristi za živice. Slabo podnosi hladne zime i mraz, tako da uspijeva samo u područjima s umjerenom klimom. Veoma je rasprostranjen u primorskom području Hrvatske, sjevernoj Italiji, južnoj Francuskoj, Španjolskoj, Portugalu te obali sjeverne Afrike. Izvan ovih područja nalazi se samo u uzgoju, primjerice kao ukrasna biljka, za dobivanje eteričnog ulja i začina.

Ružmarin je gusti, trajni, razgranati, vazdazeleni mediteranski grm s mnogo šibastih ogranaka, koji je visok 1 do 2 metra. Starije stabljike su drvenaste, a mlađe četverobridne kao i u ostalih usnatica, čvrstih, uskih, gotovo igličastih, kožastih, odozgo zelenih i glatkih, a na naličju od dlaka sivkastobijelih listova koji su dugi 2 do 3 centimetra. Na kratkim ograncima, razvijaju se maleni cvjetovi, svijetloplave do plavoljubičaste boje (Slika 3.) (Kuštrak, 2005; Toplak Galle, 2005). Cvate kroz čitavu godinu, najintenzivnije od ožujka do svibnja kada se i skuplja. Nakon sušenja, odvajaju se listovi i cvjetići koji se dalje koriste u različite svrhe (Gursky, 1999).



Slika 3. *Rosmarinus officinalis* L. (www.plantea.com.hr)

1.2. KEMIJSKI SASTAV BILJNIH DROGA

1.2.1. Menthae piperitae folium

Glavnom terapijski aktivnom sastavnicom droge *Menthae piperitae folium* smatra se eterično ulje, prisutno u količini od 1 do 3%. Najznačajniji sastojci eteričnog ulja su monoterpeni: mentol, menton, mentilacetat, mentofuran, limonen, izomentol, neomentol, pulegon i karvon. Također su prisutni i seskviterpeni kao što je viridoflorol. Uz, eterično ulje, droga sadrži i druge terapijski značajne sastavnice, poput spojeva istraživanih u ovom radu – flavonoida i fenolnih kiselina. Najzastupljeniji flavonoidi su: luteolin i njegov 7-glukozid, rutin, hesperidin, eriocitrin i razni visoko oksidirani flavoni (Marković, 2005; ESCOP, 2003), a fenolne kiseline: ružmarinska i fenilkarboksilne kiseline poput kavene, kumarne te ferulinske kiseline (Toplak Galle, 2005). Treba spomenuti i prisutnost male količine triterpenskih kiselina: ursolne i oleanolne kiseline te karotenoida, betaina, kaolina i mineralnih soli (Gursky, 1999).

1.2.2. Origani herba

Zelen mravinca sadrži manje eteričnog ulja od ostalih obrađivanih biljaka (0,15 – 4%), a glavne sastavnice ulja su monoterpeni: limonen, pinen, ocimen, timol, karvakrol, cimol te seskviterpeni: farnezol, kariofilen i β -bisabolen. Ostale prisutne tvari od farmaceutskog značaja su trjeslovine, ružmarinska kiselina, gorke tvari, vitamin C te flavonoidi: apigenin, luteolin, kvercetin i skutelarin (Gutiérrez-Grijalva i sur., 2018; Kuštrak, 2005; Gursky, 1999).

1.2.3. Rosmarini folium

Listovi ružmarina (*Rosmarini folium*) sadrže 1 do 2,5% eteričnog ulja čiji sastav varira ovisno o podrijetlu biljnog materijala, razvojnom stadiju biljke i vremenu sabiranja. Razlikuju se 4 kemotipa: verbenon/bornil acetat, 1,8-cineol, kamfor i β -mircen/kamfor (Marković, 2005). Općenito, glavne sastavnice eteričnog ulja su monoterpeni: 1,8-cineol, kamfor, kamfen, α -pinen, borneol, bornilacetat, α -terpineol, β -kariofilen, β -pinen i limonen. Droga *Rosmarini folium* sadrži i druge sastavnice, kao što su fenolne kiseline; primjerice ružmarinsku kiselinu, diterpensku karnozolnu kiselinu te triterpenske kiseline (ursolnu i oleanolnu). Ostali diterpenoidi koji se mogu pronaći u ovoj biljci su: karnozol, rozmanol, izorozmanol, epirozmanol, rozmaridifenol, rozmarikinon i derivati hidroksicimetne kiseline. Od triterpenoida nalaze se: α - i β -amirin i roficeron. S medicinskog gledišta veoma važni sastojci su flavonoidi, od kojih su u listovima ružmarina ponajviše prisutni: luteolin, nepetin, nepitrin, genkvanin, diosmetin i njihovi heterozidi (Kuštrak, 2005; ESCOP, 2003).

1.3. FARMAKOLOŠKI UČINCI I UPORABA BILJNIH DROGA

1.3.1. *Menthae piperitae folium*

Droga *Menthae piperitae folium* je od davnina neizostavna u pučkoj medicini te joj se pripisuju brojna ljekovita djelovanja. Najčešće se koristi zbog svog spazmolitičkog djelovanja, odnosno opuštanja glatke muskulature probavnog trakta, ublažavanja grčeva i smanjivanja nadutosti. Općenito djeluje umirujuće pri probavnim tegobama pa tako i ublažava mučninu, a prikladna je i za trudnice. Stimulira lučenje žuči pa se koristi kod žučnih kolika. Opušta glatku muskulaturu respiratornog trakta te stoga djeluje povoljno kod poremećaja dišnog sustava, primjerice prehlade i kašlja. Zatim, zbog sadržaja mentola lokalno proširuje krvne žile i izaziva osjećaj hlađenja pa se upotrebljava izvana za ublažavanje svrbeža, različitih boli uključujući neuralgiju i peludne hunjavice. Pripisuje joj se i analgetički učinak, kao što je primjerice kod bolnih mjesečnica i migrene, prilikom koje se primjenjuje lokalno na područje čela i sljepoočnica. Poput brojnih drugih eteričnih ulja i eterično ulje paprene metvice (*Menthae piperitae aetheroleum*) posjeduje antiseptički, odnosno antibakterijski i antivirusni učinak. Uz sve navedeno, listovima paprene metvice pripisuje se umirujuće djelovanje kod psihičkih poremećaja. Pripravci paprene metvice mogu se primjenjivati unutarnjim i vanjskim putem te kao inhalacije, ovisno o ljekovitom obliku, od kojih se najčešće upotrebljavaju eterično ulje, oparak ili čajna mješavina. Izrađuju se i brojni drugi pripravci poput tinktura, pastila, kapsula, tableta te kozmetičkih pripravaka, kupki, krema i masti. Ne smije se koristiti kod dojenčadi i malene djece jer postoji rizik od nastanka laringospazma i gušenja. Neželjena djelovanja nastala uslijed primjene pripravaka paprene metvice su veoma rijetka, ali su zabilježena. Primjerice, uslijed dugotrajne vanjske primjene velikih količina eteričnog ulja može doći do crvenila kože uz pojavu mjehurića. Zatim, zabilježena je pojava alergija, treperenja srčanih pretklijetki te reflektoričkih grčeva uslijed inhalacija, no radi se o vrlo rijetkim događajima koji se mogu zanemariti. Ipak, najčešće se primjenjuje kao pomoćni sastojak u različitim pripravcima, odnosno korigens okusa i mirisa, za izradu voda i sprejeva za usta, zubnih pasta te različitih prehrambenih proizvoda, čokolada, žvakaćih guma i likera (Kuštrak, 2005; Toplak Galle, 2005).

1.3.2. Origani herba

Od davnina je poznata uporaba zeleni mravinca kao začina, poznatijeg pod nazivom „origano“. Naime, povijest uporabe origana seže još u doba drevne Grčke, a zadržala se sve do današnjih dana, najviše u mediteranskim zemljama gdje se koristi u raznim jelima, od pizze do tjestenine, najčešće uz rajčicu.

Od terapijskih primjena, droga Origani herba se najčešće koristi za ublažavanje respiratornih tegoba, primjerice kašlja, ali čak i astme. Pokazala je stimulirajuće djelovanje na probavu. Stoga se smatra karminativom koji ujedno poboljšava rad jetre i žučnog mjehura te ublažava grčeve probavnog trakta pa se preporučuje njena upotreba kod crijevnih i želučanih tegoba. Ujedno, zbog sadržaja trjeslovina i njihovog adstringentnog djelovanja, može se koristiti za ublažavanje proljeva. Kao i brojna druga eterična ulja, i ulje zeleni mravinca posjeduje antiseptičko djelovanje pa se razrijeđene vodene otopine mravinca koriste za dezinfekciju grla, usne šupljine i rana. Smatra se da djeluje umirujuće na vegetativno živčevlje te se stoga mravinčeve kupke koriste za opuštanje kod raznih psihičkih oboljenja. U narodnoj medicini se još preporučuje kod epilepsije, ugriza otrovnih životinja i kao anthelmintik. Smatra se sigurnom biljnom drogom ukoliko se koristi u preporučenim dozama, no treba izbjegavati primjenu za vrijeme trudnoće (Kuštrak, 2005; Pahlow, 1989).

1.3.3. Rosmarini folium

Ružmarin je najčešće korišten kao začim, posebice u mediteranskoj kuhinji uz pečenu ribu, meso ili povrće te kao ukrasna biljka. Dobro je poznato da na svadbama ljudi ukrašavaju revere upravo ružmarinom jer simbolizira vjernost i bračnu sreću. Upotrebljavan je u veterini, za poticanje teka u slabih životinja, kod kolika, za ispiranje rana i njihovo brže cijeljenje (Toplak Galle, 2005).

Od terapijskih primjena ružmarina, ističe se djelovanje na poboljšanje krvotoka što je posljedica prisutnosti rubefacijensa kamfora. U obliku razrijeđenog eteričnog ulja ili masti u kombinaciji s drugim biljkama, nanosi se na bolne dijelove tijela kod reumatičnih bolova, neuralgije, iščašenja i oduzetosti (Gursky, 1999). U svrhu poboljšanja prokrvljenosti uslijed smetnji cirkulacije zbog oslabljenog srca primjenjuje se i čajna mješavina s ružmarinom, popularno nazvana Kneippov čaj. Osim spomenutog, koristi se kod probavnih tegoba, vjetrova i lakših grčeva, zatim za poboljšanje funkcije jetre i pojačanu sekreciju žuči (Kuštrak, 2005). Poznata je primjena kupki ružmarina kod opće iscrpljenosti, psihičkih smetnji i niskog krvnog tlaka, smatra se da ima stimulativno djelovanje. Upravo zbog navedenih učinaka, odnosno mogućih poteškoća s usnivanjem, ne preporučuje se uporaba kupelji uvečer. U narodnoj medicini se zadržalo vjerovanje da ružmarin poboljšava spolnu moć i pamćenje (Toplak Galle, 2005; Pahlow, 1989).

Kao i brojna druga eterična ulja, tako i ružmarinovo, pokazuje u *in vitro* uvjetima antimikrobno i antivirusno djelovanje. Prisutnost flavonoida i fenolnih kiselina odgovorna je za antioksidativno djelovanje pa se stoga može koristiti u prehrambenoj industriji kao antioksidans. Vjeruje se da djeluje antiflogistički i da sprječava nastanak upala. Poneki *in vitro* i *in vivo* eksperimenti su pokazali potencijal za citotoksično djelovanje, odnosno smanjenje inicijacije i promocije tumorigeneze uzrokovane karcinogenima. Nadalje, smatra se da bi sastavnice ružmarina mogle posjedovati hiperglikemički učinak. *In vivo* istraživanja su pokazala antiestrogeno djelovanje. Naime, istodobna primjena metanolnog ekstrakta ružmarina je ubrzavala jetreni metabolizam estrogena, kako reakcije prve oksidoredukcijske faze, tako i konjugacijske, što bi moglo predstavljati još jedan mehanizam antitumorskog djelovanja (ESCOP, 2003). Ukoliko se upotrebljava u propisanim količinama, ne bi trebao imati štetne posljedice na zdravlje pojedinca. Peroralno korištenje eteričnog ulja bi se svakako

trebalo izbjegavati radi nadražujućeg djelovanja na želudac, crijeva i bubrege. Jednako tako, primjena u trudnoći nije preporučena (Pahlow, 1989).

1.4. FENOLNI SPOJEVI U BILJKAMA

Fenolni spojevi su veoma raznolika i široko rasprostranjena skupina sekundarnih metabolita biljaka s brojnim fiziološkim ulogama. S gledišta biljke, važni su za rast, razmnožavanje, zaštitu od patogena i predatora, a ujedno pridonose obojenosti, mirisu i ostalim opažajnim svojstvima koja mogu dati selektivnu prednost pojedinoj biljnoj vrsti. Njihova razina u biljkama se povećava tijekom rasta ili odgovora na različita stresna stanja: infekcije, ozljede, UV zračenje i slično. Za čovjeka, fenolni spojevi imaju brojne povoljne fiziološke učinke: antialergijske, protuupalne, antiaterogene, antioksidativne, antimikrobne, antitrombotske, kardioprotektivne te vazodilatacijske (Balasundram, 2006).

Poznato je više od 8000 strukturno različitih spojeva čija je zajednička odlika prisutnost jednog ili više aromatskih prstena te na njima jednako toliko hidroksilnih skupina (Huang i Cai, 2010).

Tablica 1. Podjela biljnih fenolnih spojeva prema osnovnim strukturnim obilježjima
(Balasundram, 2006)

BROJ UGLJIKOVIH ATOMA	POJEDNOSTAVLJENA STRUKTURA	TIP FENOLNOG SPOJA
6	C_6	Jednostavni fenoli, benzokinoni
7	C_6-C_1	Hidroksibenzoati
8	C_6-C_2	Acetofenoni, fenilaceteti
9	C_6-C_3	Hidroksicinamati, fenilpropanoidi
10	C_6-C_4	Naftokinoni
13	$C_6-C_1-C_6$	Ksantoni
14	$C_6-C_2-C_6$	Stilbeni, antrakinoni
15	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoidi, izoflavonoidi
18	$(C_6-C_3)_2$	Lignani, neolignani
30	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonoidi
n	$(C_6-C_3)_n$	Lignini
n	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Kondenzirane trjeslovine

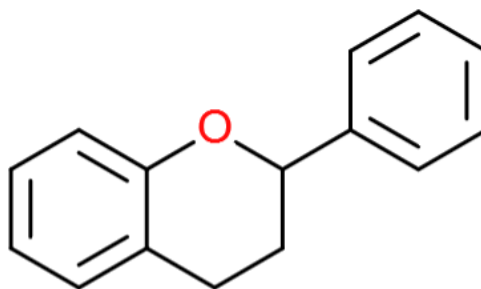
1.4.1. Flavonoidi

Ljudi se s flavonoidima susreću od drevnih vremena. Iako se nije znalo o kojim se točno spojevima radi, bili su poznati kao pigmenti. Nešto kasnije, počeli su se upotrebljavati za bojenje pamuka i vune pa zatim i u slikarstvu. Tako su i dobili ime, od latinske riječi *flavus*, što znači žut. Kemijska struktura im je identificirana krajem 19., a u raznim biljkama su karakterizirani početkom 20. stoljeća. Najprije je bio otkriven utjecaj flavonoida iz vrsta roda *Citrus* L. na propusnost krvnih kapilara te se njihova uloga smatrala toliko važnom da su nazvani vitaminom P. No, ta teza nije dugo zaživjela (Perez-Vizcaino i Fraga, 2018).

Široko su rasprostranjeni u biljnom svijetu. Nalaze se slobodni ili u obliku heterozida (glikozida), tj. konjugata s raznim šećerima. Pretpostavlja se da je prosječan dnevni unos flavonoida oko 1 gram. Od svakodnevno primjenjivanih namirnica bogatih flavonoidima mogu se istaknuti: voće (najviše citrusno), povrće, crno vino i zeleni čaj. Budući su pigmentirani, očekuje se da su prisutni samo u obojenim cvjetovima i plodovima, ali nalaze se i u drugim dijelovima biljaka, kao što su listovi, stabljike, drva, korijenje i podanci (Chun i sur., 2005; Toplak Galle, 2005).

Svim flavonoidima je zajednička osnovna struktura koja se sastoji od 15 ugljikovih atoma (Slika 4.). Međusobno se razlikuju po stupnju oksidacije, rasporedu hidroksilnih i metoksilnih skupina te vezanim šećerima. Nazivaju se i benzopiranskim heterozidima (glikozidima) jer im je aglikon derivat benzopirana.

Glavnim podskupinama flavonoida smatraju se: flavoni, flavonoli, izoflavoni, flavanoni, flavanonoli, kalkoni, antocijanidini, leukoantocijanidini, procijanidini, katehini i auronni (Kuštrak, 2005; Toplak Galle, 2005).



Slika 4. Osnovna struktura flavonoida

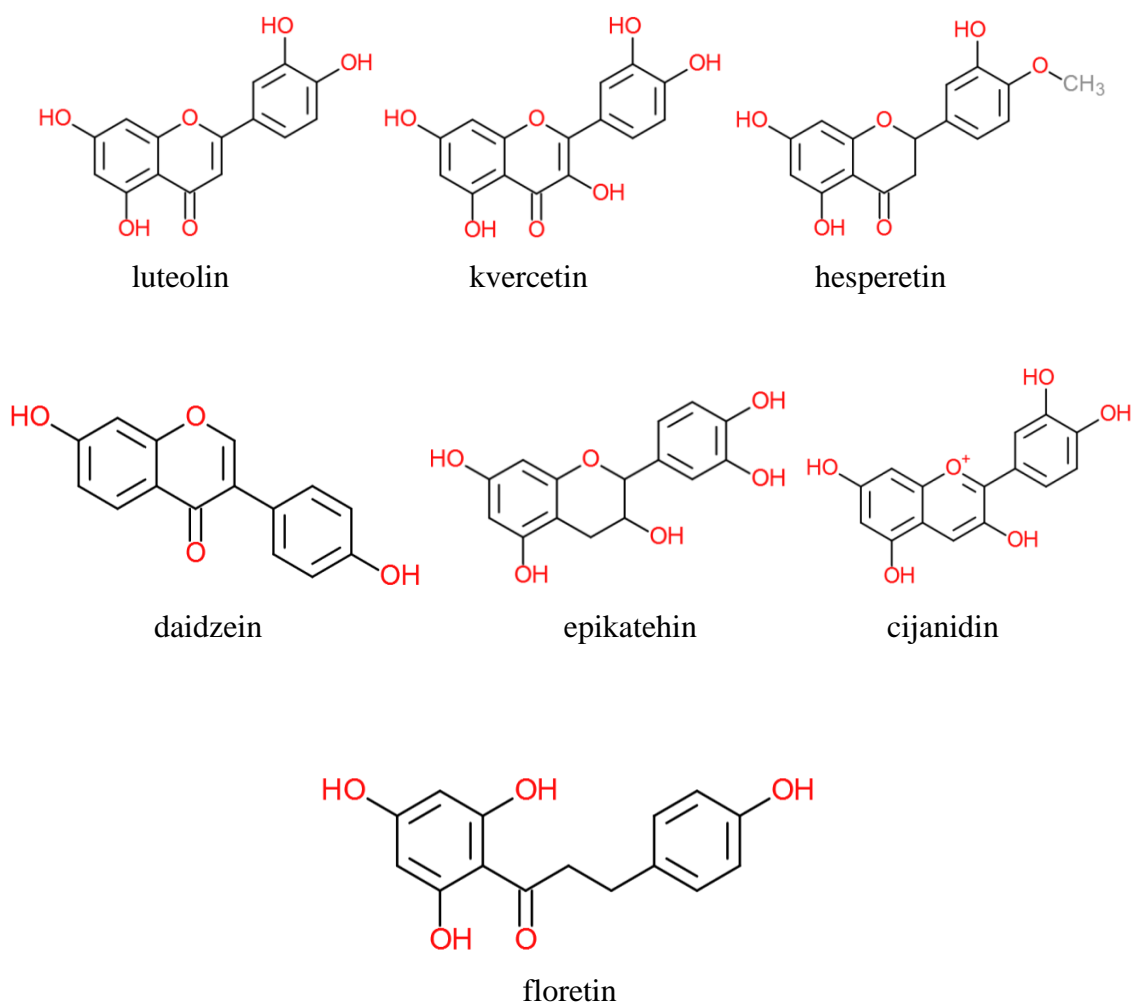
Fiziološke uloge u biljkama su im različite: privlače insekte na oprašivanje, pružaju zaštitu od štetnih insekata, virusa i gljivica, sprječavaju djelovanje nekih enzima te utječu na oksidacijske i redukcijske procese u stanici (Toplak Galle, 2005).

Flavonoidima u ljudskom organizmu, odnosno ljepše nazivanim bioflavonoidima se pripisuju brojna terapijska djelovanja. Ona ovise o vrsti flavonoida, tj. o udjelu pojedinih bioflavonoida u njihovim prirodnim izvorima putem kojih se primjenjuju. Najčešće spominjani pozitivni medicinski učinci su: spazmolitski, koleretski, hepatoprotektivni, diuretski, dijaforetski, protuupalni, antialergijski, antisklerotički, kardioprotektivni te blagotvorni učinci na krvotok, koronarne krvne žile, vene i kapilare. Antioksidativno djelovanje podrazumijeva smanjenu infiltraciju upalnim stanicama, nižu razinu proupalnih citokina, smanjenje tkivne fibroze te poboljšano preživljavanje i funkciju stanica (Kuštrak, 2005; Toplak Galle, 2005). Korisnost flavonoida najbolje predočava činjenica da je kombinacija hesperidina i njegovog derivata diosmina registriran lijek na tržištu brojnih zemalja koji se izdaje na recept u ljekarnama. Indiciran je za liječenje kronične venske insuficijencije donjih ekstremiteta i akutne hemoroidalne bolesti, a pripisuje mu se smanjenje venske distenzibilnosti i venskog zastoja te smanjenje kapilarne propusnosti i povećanje kapilarne permeabilnosti (www.halmed.hr). Novija istraživanja su pokazala da flavonoidi smanjuju postprandijalnu glikemiju djelujući u tankom crijevu te inhibirajući α -amilazu, α -glukozidazu i o natriju ovisan glukozni transporter. Uz to, smatra se da flavonoidi pozitivno utječu na homeostazu glukoze i inzulina brojnim signalnim putevima, povećavaju osjetljivost na inzulin, smanjuju de novo lipogenezu, povećavaju β -oksidaciju masnih kiselina, lučenje inzulina te smanjuju glukotoksično djelovanje na β -stanice Langerhansovih otočića gušterače. Nadalje, bioflavonoidi uzrokuju vazorelaksaciju i smanjenje krvnog tlaga povećavajući ekspresiju NO sintaze i posljedično nastanak većih količina dušikova oksida. Uočeno je da dovode do smanjenog povećanja tjelesne mase uslijed povećanog unosa hranjivih tvari što se pripisuje različitim mehanizmima koji dovode do povećane potrošnje energije i razgradnje masnoća.

Intestinalna mikrobiota razgrađuje flavonoide na razne fenolne, odnosno aromatske metabolite koji se bolje apsorbiraju od izvornih tvari te i zbog povećanog poluživota, postižu veće koncentracije u krvi ispitanika. Tako nastali metaboliti suprimiraju proizvodnju proupalnih citokina i adhezijskih molekula. Ujedno, sami flavonoidi djeluju prebiotički pa mogu dovesti do promjena u sastavu crijevne mikroflore, što može imati pozitivne

metaboličke posljedice. Također, flavonoidi mogu stimulirati mikrobiotu na povećanu proizvodnju kratkolančanih kiselina, koje imaju najviše 6 ugljikovih atoma poput: octene, propionske i maslačne. Stvaranje spomenutih metabolita ima pozitivne učinke na homeostazu glukoze i inzulina, metabolizam drugih hranjivih tvari i upalne procese (Mozaffarian i Wu, 2018).

U flavonoide koji se najčešće susreću u biljnom svijetu ubrajaju se: flavoni (luteolin, apigenin, tangeritin, baikalein, nobiletin, sinensetin), flavonoli (kvercetin, rutin, kemferol, miricetin, fisetin), flavanoni (hesperetin, hesperidin, naringenin, naringin, eriodiktiol), izoflavonoidi (genistein, genistin, daidzein, daidzin, glicitein), katehini (epigalokatehin, epikatehin, teaflavin), antocijanidini (cijanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin) i kalkoni (floridzin, floretin, kalkonaringenin) (Slika 5.) (Panche i sur., 2016).



Slika 5. Strukture pojedinih flavonoida

1.4.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su vrlo zastupljeni fenolni spojevi u biljnom svijetu. U svojoj strukturi uz fenolni prsten sadrže najmanje jednu karboksilnu skupinu. Pronalaze se u slobodnom obliku ili češće kao konjugati, odnosno esteri, eteri i acetali koje čine s drugim prirodnim spojevima poput šećera, alkohola, flavonoida, masnih kiselina, sterola, proteina, terpena i drugih (Goleniowski i sur., 2013). Prisutne su u različitim dijelovima biljaka. Gledajući s mikroskopske, odnosno substancične razine, ovisno o njihovoj topljivosti, mogu se naći u staničnim stijenkama, vakuolama i jezgrama (Hutzler i sur., 1998). No, gledajući makroskopski, nalaze se u gotovo svim biljnim organima.

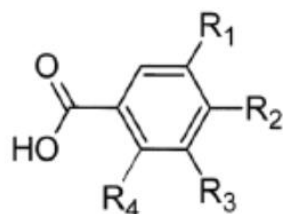
Njihova uloga nije u potpunosti razjašnjena. Smatra se da sudjeluju u procesima unosa hranjivih tvari, sintezi proteina, fotosintezi, enzimskim procesima, alelopatiji te da su također važne kao strukturne sastavnice biljaka. Alelopatski učinci fenolnih kiselina nisu specifični s obzirom na vrstu. Djeluju kao prirodni herbicidi koji sprječavaju klijanje sjemenka ili rast korijena u vlastitoj blizini te na taj način osiguravaju biljci potreban prostor za rast i razvoj. Jednako tako, predstavljaju signalne molekule koje sudjeluju u interakciji između biljke i mikroorganizma.

Zbog njihove sveprisutnosti u biljnom svijetu, uključujući biljke koje se primjenjuju u svakodnevnoj prehrani kao voće, povrće i cjelovite žitarice, procijenjeni dnevni unos fenolnih kiselina za odraslu osobu iznosi između 25 miligrama i jednog grama, ovisno o obrascu prehrane. Fenolne kiseline imaju utjecaj na organoleptička, antioksidativna i nutritivna svojstva biljaka. Antioksidativni učinci su posljedica prisutnosti hidroksilne skupine na aromatskom prstenu, a ostvaruju se različitim mehanizmima, među kojima je najzastupljeniji gašenje slobodnih radikala doniranjem vodikovog atoma ili slobodnog elektrona.

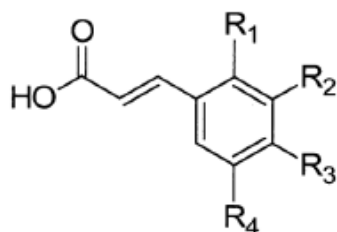
Fenolne kiseline imaju brojne važne biološke i farmakološke učinke koji mogu pozitivno utjecati na zdravlje ljudi. Smanjuju oštećenje staničja uzrokovano oksidativnim stresom, koje bi u konačnici moglo dovesti do mnogih kroničnih bolesti ili razvoja karcinoma. Također, imaju i izravan antiproliferativni učinak. Smatra se da potrošnja hrane bogate fenolnim spojevima, što je slučaj u mediteranskom načinu prehrane, korelira sa smanjenim rizikom kardiovaskularnih bolesti kao što su koronarne bolesti srca ili moždani udar. Takav učinak može se objasniti njihovom antioksidativnom aktivnošću kojom sprječavaju

oksidativne promjene lipoproteina niske gustoće (LDL-a) što je jedan od čimbenika rizika za razvoj bolesti krvožilnog sustava. Brojne fenolne kiseline pokazuju nespecifične antibakterijske i antifungalne učinke putem stanične membrane mikroorganizama. Za pojedine fenolne spojeve se smatra da imaju specifično djelovanje. Primjerice, kavenoj kiselini je pripisana inhibicija biosinteze upalnih medijatora leukotriena koji su uključeni u patofiziološke procese nastanka bolesti imunološkog sustava, astme i alergijskih reakcija. Za derivate kavene kiseline se smatra da selektivno inhibiraju integrazu virusa humane imunodeficijencije tipa 1 (HIV 1) te na taj način sprječavaju ugradnju virusne DNA u domaćinsku. Galna kiselina smanjuje znakove alergije djelujući kao antihistaminik. Također koči transkripcijsku aktivnost AP-1 proteina koji je uključen u upalne procese, diferencijaciju i proliferaciju stanica te se stoga smatra protuupalnim agensom (Goleniowski i sur., 2013).

Ovisno o osnovnoj strukturi, fenolne kiseline se dijele u dvije skupine; na derivate hidroksibenzojeve kiseline opće formule C₆-C₁ (Slika 6.) te na derivate hidroksicimetne kiseline prikazane općom formulom C₆-C₃ (Slika 7.) (Balasundram i sur., 2006; Kovačević, 2004).

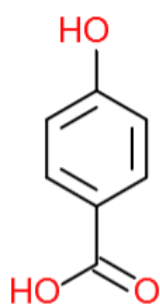


Slika 6. Osnovna struktura derivata hidroksibenzojeve kiseline

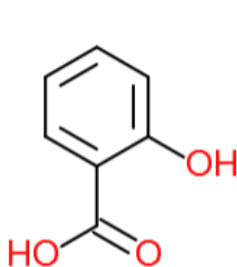


Slika 7. Osnovna struktura derivata hidroksicimetne kiseline

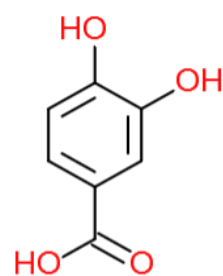
Derivati hidroksibenzojeve kiseline na aromatskom prstenu uz karboksilnu imaju i hidroksilnu skupinu te su mogući i drugi supstituenti na ostalim položajima u prstenu. Najpoznatiji spojevi, odnosno kiseline su: *p*-hidroksibenzojeva, salicilna, protokatehinska, 2,3-dihidroksibenzojeva, 3,5-dihidroksibenzojeva, 2,5-dihidroksibenzojeva, galna, siringična i vanilinska kiselina (Slika 8.). Međusobno se razlikuju po položaju hidroksilacije i metilacije benzenskog prstena, odnosno metilacije hidroksilne skupine. Najčešće se nalaze u topljivom obliku, konjugirane sa šećerima ili organskim kiselinama, ili netopljivom obliku, vezane za sastavnice stanične stijenke.



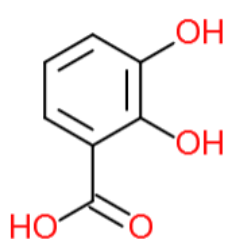
p-hidroksibenzojeva kiselina



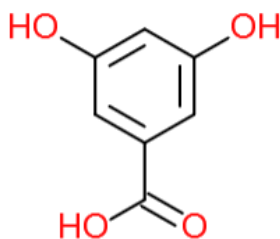
salicilna kiselina



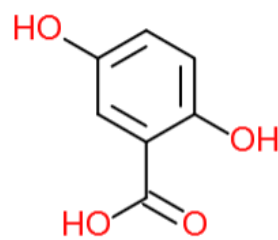
protokatehinska kiselina



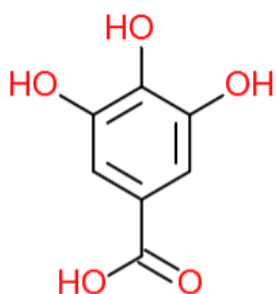
2,3-dihidroksibenzojeva
kiselina



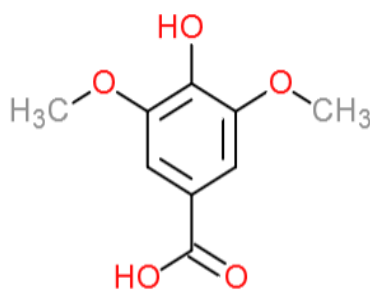
3,5-dihidroksibenzojeva
kiselina



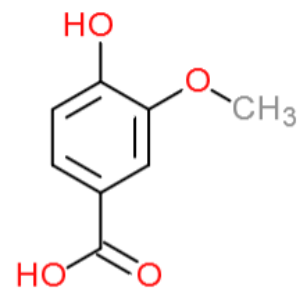
2,5-dihidroksibenzojeva
kiselina



galna kiselina



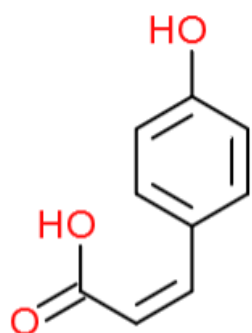
siringična kiselina



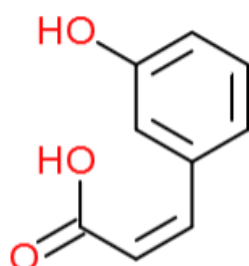
vanilinska kiselina

Slika 8. Derivati hidroksibenzojeve kiseline

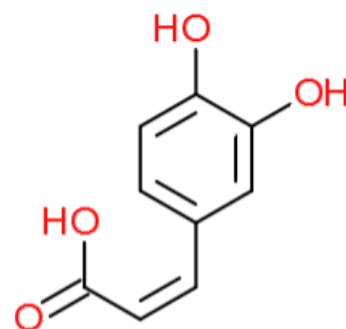
Najzastupljeniji derivati hidroksicimetne kiseline su: *p*-kumarinska, *o*-kumarinska, kavena, ferulinska, izoferulinska i sinapinska kiselina (Slika 9.). Zajednička im je prisutnost hidroksilne skupine na aromatskom prstenu te postraničnog lanca od 3 ugljikova atoma s dvostrukom vezom na položaju 2, na kraju kojeg se nalazi karboksilna skupina. U biljkama se nalaze u obliku monomera, dimera, amida te esterificirane s hidroksilnim skupinama hidroksi kiselina, šećera i drugih polimera (Goleniowski i sur., 2013; Huang i Cai, 2013).



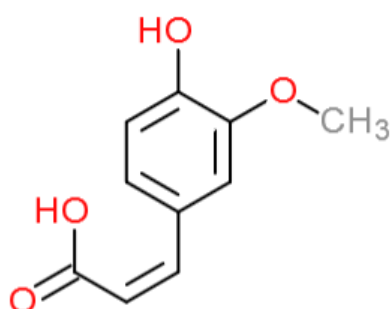
p-kumarinska kiselina



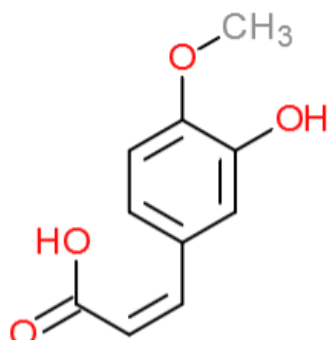
o-kumarinska kiselina



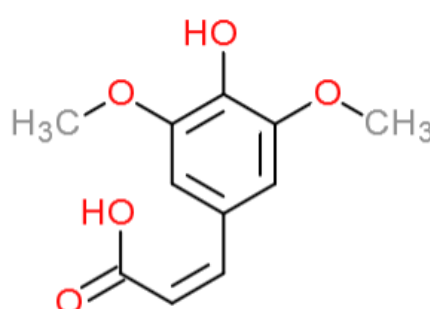
kavena kiselina



ferulinska kiselina



izoferulinska kiselina



sinapinska kiselina

Slika 9. Derivati hidroksicimetne kiseline

1.5. ANTIAGREGACIJSKO DJELOVANJE

U širem smislu, pod pojmom antitrombotskog djelovanja lijekova, podrazumijevaju se tri različita učinka: antiagregacijski, antikoagulacijski i fibrinolitički. Lijekovi s antiagregacijskim učinkom (klopidogrel, acetilsalicilna kiselina, tiklopidin, tirofiban, treprostini) onemogućuju međusobno prijanjanje trombocita i stvaranje funkcionalnog krvnog ugruška. Preciznije gledajući, svaki od tih učinaka je različit, iako pokazuju sinergizam. Antikoagulacijski lijekovi (varfarin, dabigatran, rivaroksaban) djeluju na koagulacijsku kaskadu te inhibiraju njezino odvijanje sprječavajući zgrušavanje krvi. Manje slični lijekovi, ali koji također djeluju na krve ugruške su fibrinolitici (urokinaza, streptokinaza, alteplaza, tenekteplaza). Primjenjuju se neposredno nakon kardiovaskularnog incidenta s ciljem brze razgradnje nastalog krvnog ugruška i ponovne uspostave krvotoka u zahvaćenom dijelu organizma.

Trombociti nastaju u koštanoj srži iz pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica, koje se najprije diferenciraju u megakariocite, od kojih se zatim otkidaju pojedini dijelovi te nastaju konačne funkcionalne stanice. Usitnjavanje megakariocita se uglavnom događa prilikom prelaska u krvotok, protiskivanjem kroz kapilare. Trombociti su sitne, okrugle ili ovalne krvne pločice promjera 1 do 4 mikrometra. Normalno ih u litri krvi ima od 150 do 300×10^9 . Nemaju jezgru zbog čega se ne mogu dijeliti, ali imaju brojne druge karakteristike stanica, što osigurava njihovu funkcionalnost. Za djelovanje krvnih pločica ključni su čimbenici koji se nalaze u unutrašnjosti stanice (aktin, miozin, ATP, ADP, Ca^{2+} , prostaglandini, čimbenik stabilizacije fibrina, čimbenici rasta) te anatomska-fiziološka građa stijenke, na čijoj se površini nalaze brojni glikoproteini koji sprječavaju prijanjanje trombocita na normalnu stijenku krvnih žila, ali ujedno omogućavaju na oštećene stijenke. Uz glikoproteine, za svrhovitost stijenke, važna je prisutnost fosfolipida koji djeluju aktivacijski u procesima zgrušavanja krvi. Poluvijek života trombocita je između 8 i 12 dana, a uklanjaju se iz krvi uglavnom sustavom tkivnih makrofaga.

Uloga trombocita u procesu zaustavljanja krvarenja iz oštećenih krvnih žila je dvojaka. Kada se radi o malenom razdoru krvne žile, kakvih svakodnevno nastaje nekoliko tisuća, oštećenje se zatvara trombocitnim čepom, a ne stvaranjem krvnog ugruška. Trombociti dolaze u dodir s oštećenom stijenkom krvne žile, naročito s vlaknima kolagena, nakon čega se trenutno promijene njihova svojstva. Počinju bubriti, poprimaju nepravilne oblike, brojni

zrakasti izdanci strše s njihove površine, kontraktilne bjelančevine se snažno stežu, dolazi do otpuštanja brojnih aktivnih čimbenika, postaju ljepljivi te prijanjaju za okolne bjelančevine. Otpuštanjem brojnih čimbenika, djeluju na okolne trombocite, uzrokuju njihovu aktivaciju što dovodi do agregacije i stvaranja trombocitnog čepa koji zaustavlja krvarenje. Druga uloga trombocita u zaustavljanju krvarenja javlja se kod većih ozljeda krvnih žila. Najprije koagulacijskom kaskadom nastaje aktivator protrombina, koji zatim pretvara protrombin u proteolitički enzim trombin. Trombin djeluje na fibrinogen, proteolitički ga kida do fibrinskog monomera koji se polimerizira u duge fibrinske niti i nastaje mrežica krvnog ugruška. U početku je ta mrežica veoma rahla, a fibrinske niti su vezane nekovalentnim vezama. Zatim na nju djeluje čimbenik stabilizacije fibrina koji omogućava kovalentno povezivanje fibrinskih niti. Na takvu, čvrstu mrežicu prijanjaju trombociti i plazma te dolazi do stvaranja krvnog ugruška. S vremenom, dolazi do stezanja ugruška te se nakon 20 do 60 minuta istisne većina tekućine, ugrušak postaje čvrst, a krvarenje prestaje. Proces zaustavljanja krvarenja završava tako da u krvni ugrušak prodiru fibroblasti koji stvore vezivno tkivo u cijelom ugrušku ili da se ugrušak fibrinolitičkim djelovanjem nastalih enzima otopi (Guyton i Hall, 2005).

Funkciju trombocita kontroliraju tri skupine tvari. Prvu skupinu čine tvari koje nastaju izvan trombocita kao što su trombin, kolagen, prostaciklini i kateholamini te djeluju na trombocite preko površinskih receptora. U drugu skupinu ubraja se ADP, prostaglandini i serotonin, koji nastaju u samim trombocitima, ali jednako kao i tvari prve skupine, djeluju na membranske receptore. A u treću skupinu svrstavaju se tvari koje nastaju u trombocitima i djeluju u njihovoj unutrašnjosti poput prostaglandin endoperoksida i tromboksana A_2 , cikličkih nukleotida cAMP i cGMP te kalcijevih iona.

Iako je agregacija trombocita, odnosno stvaranje krvnih ugrušaka fiziološki proces koji sprječava prekomjerno istjecanje krvi prilikom ozljede krvnih žila, može biti veoma opasan. U slučaju pretjeranog i bespotrebnog stvaranja krvnih ugrušaka posljedice mogu biti kobne. Stvoreni ugrušak, odnosno tromb koji se odvoji od stijenke krvne žile i slobodno putuje krvlju uzrokuje različite tromboembolijske incidente, ovisno o tome gdje je došlo do njegova odvajanja, odnosno zastoja u krvotoku. Najopasniji te potencijalno smrtonosni tromboembolijski događaji su: srčani udar prilikom čega dolazi do začepljenja koronarnih krvnih žila trombom, moždani udar gdje isto nastaje u cerebralnom krvotoku te plućna embolija koja zahvaća plućni krvotok. Svaki od nabrojenih incidenata može biti trenutno smrtonosan te je potrebna vrlo brza intervencija medicinske službe, a ukoliko osoba preživi,

često dolazi do trajnih posljedica poput kljenuti određenog dijela tijela. Zbog toga su potrebni lijekovi koji će u određenim stanjima spriječiti stvaranje ugrušaka i omogućiti normalan protok krvi te tako spriječiti kardiovaskularne incidente. Rizični čimbenici za razvoj kardiovaskularnih bolesti dijele se na one na koje se ne može utjecati (dob, spol, pozitivna obiteljska anamneza) i one na koje se može utjecati, među kojima su najvažniji: pretilost, tjelesna neaktivnost, nepravilna prehrana, pušenje i hipertenzija (Nervo i Mrkonjić, 2017).

Pretpostavljeni mehanizmi djelovanja antiagregacijskih lijekova su: inhibicija enzima ciklooksigenaze čime se smanjuje stvaranje agregacijskih prostaglandina, interferencija s receptorom za ADP koji predstavlja bitan čimbenik u međusobnom prijanjanju trombocita, blokada glikoproteinskog IIb/IIIa receptora na koji se pri agregaciji veže fibrinogen, antagonizam PAR-1 receptora, inhibicija fosfodiesteraze te oponašanje djelovanja antiagregacijskih prostaglandina (Katzung i sur., 2011).

Pretpostavljeni mehanizam antiagregacijskog djelovanja flavonoida je interferencija s metabolizmom arahidonske kiseline. Točnije, inhibicija stvaranja tromboksana A_2 (TxA_2) i antagonizam receptora za TxA_2 . Tromboksan A_2 je potentni vazokonstriktor i agonist krvnih pločica koji stimulira promjenu njihova oblika, uzrokuje nakupljanje i agregaciju na mjestu ozljede te rast tromba. Stoga, smanjenjem razine i blokadom učinka TxA_2 , sprječava se agregacija trombocita (Guerrero i sur., 2005).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Slijedeći trendove po pitanju uporabe biljnih pripravaka u liječenju, a i visoke učestalosti kardiovaskularnih bolesti koje predstavljaju vodeći uzrok smrti i invaliditeta u općoj populaciji, odlučili smo se na istraživanje antiagregacijskog učinka biljni vrsta *M. x piperita* L., *O. vulgare* L., i *R. officinalis* L. Navedene vrste su rasprostranjene u određenim predjelima Hrvatske, stoga su lako dostupne i eventualno otkriće njihovog pozitivnog učinka na prevenciju kardiovaskularnih bolesti, odnosno incidenata bilo bi vrlo korisno za stanovnike lijepe naše. Naime, antiagregacijski lijekovi, tj. lijekovi koji sprječavaju međusobno nakupljanje krvnih pločica su veoma upotrebljavani među velikim brojem pacijenata koji imaju povišen rizik kardiovaskularnih incidenata, odnosno kod kojih je prisutan poremećaj u agregaciji trombocita. Iako u navedenoj skupini lijekova postoje vrlo dobre, djelotvorne i relativno sigurne opcije, smatramo da bi eventualno otkriće biljnih ekstrakata i/ili sastavnica s jednakim djelovanjem predstavljalo veliki napredak u medicini te da bi se pacijenti puno češće odlučivali za takve prirodne proizvode. Isto nosi i veliku opasnost, a koja je da pacijenti zbog dostupnosti navedenih biljaka, uzimaju na svoju ruku njihove pripravke te smatraju da se na taj način sami liječe. No, uz kvalitetnu edukaciju šire populacije, kojom će se dati do znanja da takvi proizvodi nisu jednako učinkoviti, sigurni, niti provjerene kakvoće kao oni koji su proizvedeni od strane farmaceutskih tvrtki, vjerujemo da bi se takav problem spriječio. Iako je put od pretpostavke ili otkrića učinka određene supstancije do upotrebe iste u medicinske svrhe veoma dug te da bi se to dogodilo potrebno je uložiti više milijardi kuna, uvijek je potrebno napraviti prvi korak, a to su upravo ovakva temeljna istraživanja. Nadamo se da će rezultati našeg istraživanja antiagregacijskog učinka biljnih vrsta hrvatske flore, jednog dana biti iskorišteni upravo za razvoj novog lijeka, odnosno na dobrobit opće populacije.

3. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, u sklopu doktorske disertacije Andree Antolić, mag. pharm., univ. mag. pharm. U ovom istraživanju sudjelovalo je ukupno 15 dobrovoljaca. Svi dobrovoljci su potpisali informirani pristanak.

3.1. BILJNI MATERIJALI

U eksperimentalnom dijelu rada korišteni su usitnjeni i osušeni listovi biljnih vrsta (Slika 10.):

- *Mentha x piperita* L. skupljene 5.7.2017. u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta,
- *Origanum vulgare* L. skupljene 8.6.2017. u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta,
- *Rosmarinus officinalis* L. skupljene 30.6.2017. u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta,
- *Rosmarinus officinalis* L. bez cvijeta skupljene 2017. u Orebiću na poluotoku Pelješcu,
- *Rosmarinus officinalis* L. s cvijetom skupljene 2017. u Orebiću na poluotoku Pelješcu.



Slika 10. Biljni materijali korišteni tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada

3.2. APARATURA I KEMIKALIJE

Za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja flavonoida i fenolnih kiselina upotrijebljen je UV-VIS spektrofotometar Varian Cary 50 Bio (Varian Inc., SAD) Zavoda za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Hrvatska.

Za određivanje količine flavonoida korištene su sljedeće kemikalije:

- aceton,
- 25%-tna kloridna kiselina,
- 0,5%-tna vodena otopina heksametilentetramina,
- etilacetat,
- 0,5%-tna vodena otopina natrijevog citrata,
- otopina aluminijevog klorida (2 g $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ otopi se u 100 mL 5%-tne metanolne otopine octene kiseline),
- 5%-tna metanolna otopina octene kiseline,
- destilirana voda.

Za kvantitativnu analizu fenolnih kiselina upotrijebljeni su:

- 50%-tni etanol,
- 0,5 mol/dm³ kloridna kiselina,
- otopina natrijevog nitrita s natrijevim molibdatom (10 g NaNO_2 i 10 g $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ otopi se u 100 mL vode),
- otopina natrij hidroksida (8,5 g NaOH otopi se i dopuni vodom do 100 mL),
- destilirana voda.

Određivanje agregacije provedeno je mjerenjem impedancije u kivetama s dvostrukim parom srebrnih elektroda na Multiplate[®] uređaju (Slika 11.) (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Švicarska) Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, Hrvatska.

Za određivanje agregacije trombocita korišteni su:

- ADP ($0,2 \text{ mmol/dm}^3$) (Roche Diagnostics, Švicarska)
- fiziološka otopina natrijeva klorida (0,9% NaCl) (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska),
- fiziološka otopina s kalcijevim kloridom ($0,003 \text{ mol/dm}^3 \text{ CaCl}_2$ u 0,9%-tnom NaCl) (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska).



Slika 11. Multiplate[®] uređaj za praćenje agregacije trombocita

3.3. PRIPREMA RADNIH OTOPINA

Ekstrakti korišteni za mjerenje agregacijskog učinka priređeni su tako da se 0,3 g biljnog materijala ekstrahira s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5%-tne vodene otopine heksametilentetramina zagrijavanjem do vrenja 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo. Dobiveni hidrolizat se zatim propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu, a ostaci biljnog materijala na pamuku ponovno se ekstrahiraju s 20 mL acetona grijanjem do vrenja 10 minuta. Nadalje, otopina se propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu te se ekstrakcija acetonom ponavlja još jedanput. Sjedinjeni filtrati razrjeđuju se acetonom do 100,0 mL. 50,0 mL acetonskog ekstrakta precizno se prenese u okruglu tikvicu i upari do suha na vakuumskom uparivaču Rotavapor R-200 (Buchi, Švicarska) Zavoda za farmaceutsku kemiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Hrvatska. Uparenom

ostatku, doda se 5 mL dimetilsulfoksida (DMSO; Sigma-Aldrich, Švicarska) te se u istom otapalu pripremi koncentracijski niz razrijeđenih otopina. Korišten je koncentracijski raspon od 10^{-1} do 10^{-5} (od 10 do 100 000 puta) za daljnja ispitivanja impedancijskom agregometrijom.

3.4. UZORCI KRVI

Puna krv zdravih dobrovoljaca izvađena venepunkcijom i skupljena u vakuum epruvete od 4,5 mL s citratnim antikoagulansom (Vacutainer BD, SAD) korištena je u ispitivanju antiagregacijskog učinka flavonoida. Dobrovoljci nisu uzimali lijekove koji bi utjecali na agregaciju trombocita najmanje sedam dana prije davanja uzorka krvi.

3.5. METODE ISTRAŽIVANJA

3.5.1. Identifikacija biljnog materijala

Identitet istraživane biljne vrste potvrđen je ispitivanjem vanjske i unutarnje građe skupljenih uzoraka (Domac, 2002).

3.5.2. Određivanje količine flavonoida

0,3 g biljnog materijala ekstrahira se s 20 mL acetona, 2 mL 25%-tne kloridne kiseline i 1 mL 0,5%-tne vodene otopine heksametilentetramina zagrijavanjem do vrenja 30 minuta na vodenoj kupelji uz povratno hladilo (Slika 12.). Hidrolizat se propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu, a ostaci biljnog materijala na pamuku ponovno se ekstrahiraju s 20 mL acetona grijanjem do vrenja 10 minuta. Otopina se propušta kroz pamuk u odmjernu tikvicu te se ekstrakcija acetonom ponavlja još jedanput. Sjedinjeni filtrati razrjeđuju se acetonom do 100,0 mL. 20 mL hidrolizata pomiješa se s 20 mL vode i ekstrahira jednom s 15 mL te još tri puta s po 10 mL etilacetata. Sjedinjene etilacetatne faze ispiru se dva puta s 40 mL vode i propuštaju kroz pamuk. Razrjeđuju se etilacetatom do 50,0 mL. Po 10,0 mL ove otopine prenese se u četiri odmjerne tikvice od 25,0 mL. U sve četiri tikvice dodaje se 0,5 mL 0,5%-tne vodene otopine natrijevog citrata. U tri tikvice dodaje se 2 mL otopine $AlCl_3$, a zatim se sve tikvice nadopunjuju do oznake 5%-tnom metanolnom otopinom octene kiseline.

Nakon 45 minuta izmjerena je apsorbancija otopine s aluminijevim kloridom u sloju debljine 1 cm kod 425 nm u odnosu na otopinu bez aluminijevog klorida (Christ i Müller, 1960).

Ukupna količina flavonoida izračuna se kao kvercetin prema izrazu:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 0,772}{b}$$

gdje je A = apsorbancija; b = odvaga biljnog materijala (g).



Slika 12. Ekstrakcija biljnog materijala

3.5.3. Određivanje količine fenolnih kiselina

Sadržaj fenolnih kiselina određen je prema postupku iz Europske farmakopeje (Ph. Eur., 2004).

0,1 g usitnjenog biljnog materijala ekstrahira se sa 190 mL 50%-tnog etanola na vodenoj kupelji uz povratno hladilo tijekom 30 minuta. Hladni se ekstrakt filtrira u odmjernu

tikvicu od 100,0 mL, filter papir se ispere s 5 mL etanola, a tikvica dopuni etanolom do oznake. U tri odmjerne tikvice od 10,0 mL stavi se po 1 mL etanolnog ekstrakta, 2 mL kloridne kiseline ($0,5 \text{ mol/dm}^3$), 2 mL otopine natrijevog nitrita s natrijevim molibdatom i 2 mL otopine natrijevog hidroksida. Tikvice se nadopune vodom do oznake pa se izmjeri apsorbancija na 505 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba se pripremi tako da se u odmjernu tikvicu od 10,0 mL stavi 1 mL etanolnog ekstrakta, 2 mL kloridne kiseline ($0,5 \text{ mol/dm}^3$) i 2 mL otopine natrijevog hidroksida te se nadopuni vodom do oznake.

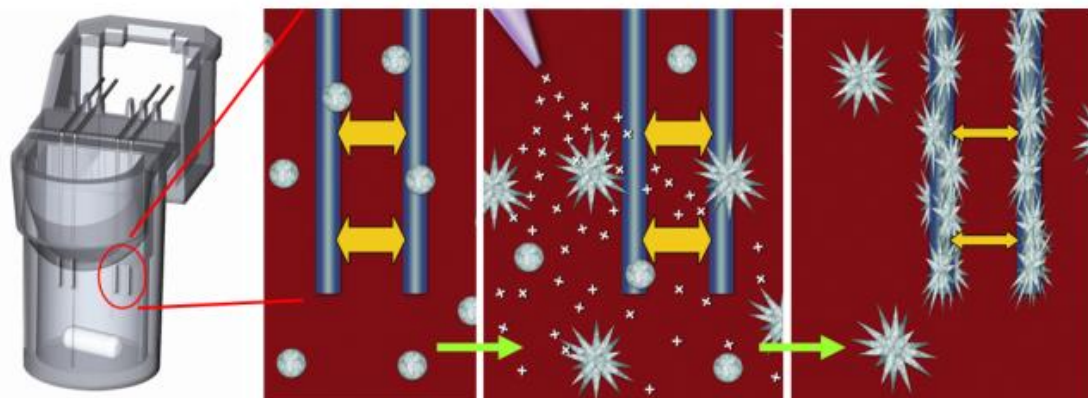
Sadržaj fenolnih kiselina izračuna se prema formuli:

$$\% \text{ fenolnih kiselina} = \frac{A \times 5}{m}$$

gdje je A = apsorbancija; m = masa biljnog materijala (g).

3.5.4. Impedancijska agregometrija

Određivanje agregacije trombocita provodi se impedancijskom metodom u punoj krvi. Mjeri se u kivetu s dva nezavisna para elektroda što osigurava kvalitetu mjerenja. Impedancijska agregometrija se zasniva na činjenici da trombociti u mirovanju nemaju sklonost stvaranju ugruška, no ukoliko dođe do aktivacije, trombociti se pričvršćuju u fiziološkim uvjetima na krvnu žilu, a u laboratorijskom testu na umjetnu površinu, odnosno elektrodu. Pri tome jača električni otpor koji se snima, a rezultat se iskazuje kao površina ispod krivulje (Slika 13.).



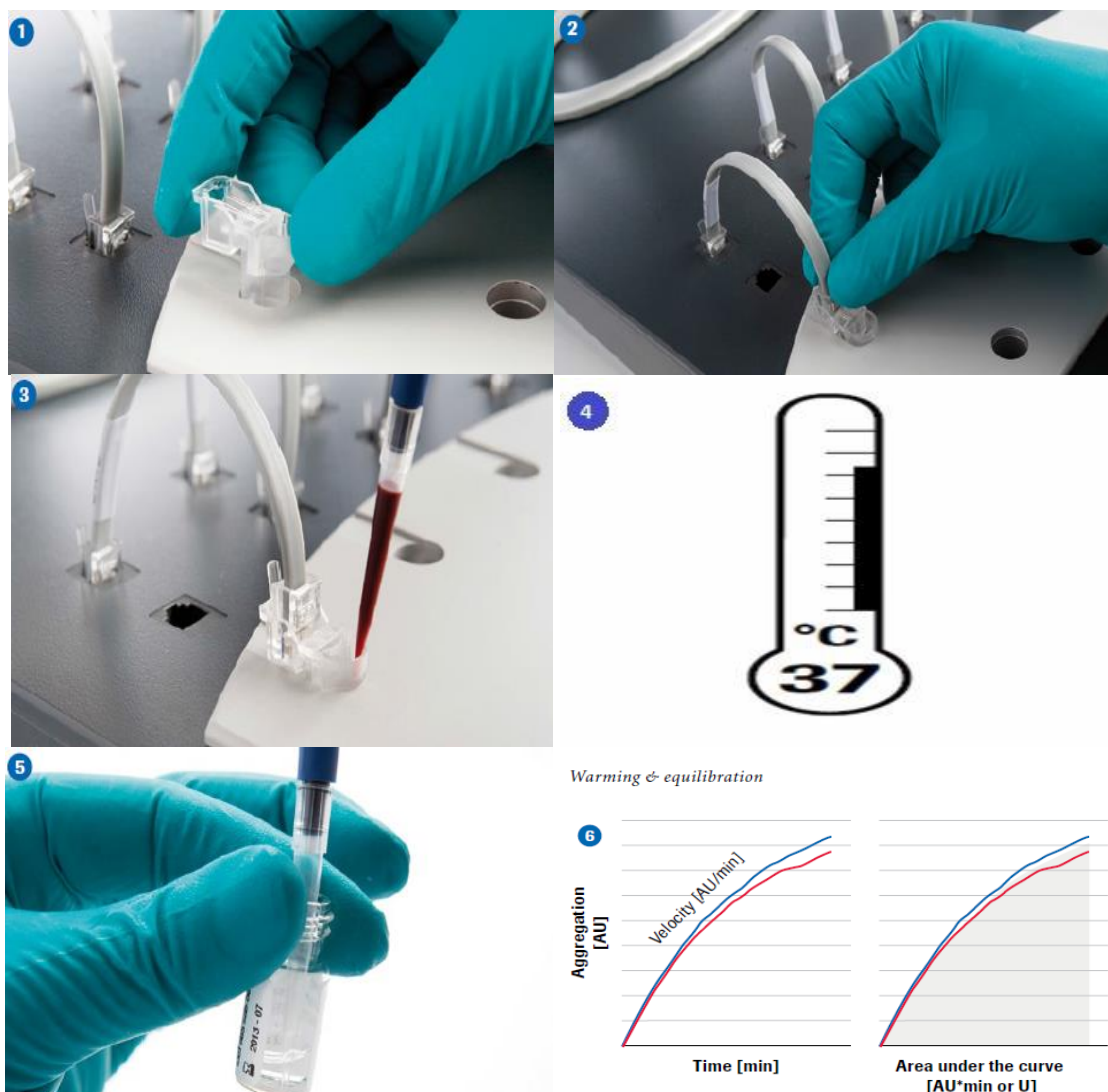
Slika 13. Princip impedancijske agregometrije

Prednost metode su brzina i jednostavnost. Kako nije potrebna dodatna obrada krvi, ne dolazi do promjene staničnog okruženja te se provjerava funkcija trombocita u fiziološkim uvjetima. Metoda se može provoditi s različitim induktorima agregacije (ADP, kolagen, ristocetin, TRAP-6, arahidonska kiselina) uz upotrebu malih volumena krvi (Paniccia i sur., 2015; Calatzis, 2007).

3.5.5. Određivanje statistički značajne antiagregacijske koncentracije

Provedba testa agregacije trombocita

Mjerenje agregacije trombocita provedeno je na Multiplate[®] uređaju. Korišten je generički postupak proizvođača instrumenta: 300 μL krvi inkubira se tijekom 3 minute s 20 μL ekstrakta i 300 μL fiziološke otopine s CaCl_2 na temperaturi od 37 $^\circ\text{C}$. Kao negativna kontrola, umjesto ekstrakta korišteno je samo otapalo – DMSO konačne koncentracije 3%. Agregacijska kaskada potaknuta je dodatkom 20 μL reagensa koji sadrži induktor agregacije ADP. Agregacija je mjerena kroz 6 minuta i izražena kao površina ispod krivulje u arbitrarnim jedinicama (AUC). Slika 14. ilustrira provedbu agregacijskog testa.



Slika 14. Provedba agregacijskog testa. 1 – postavljanje kiveta s magnetskim mješačem u inkubacijski blok Multiplate[®] analizatora, 2 – spajanje mjernih elektroda na instrument, 3 – dodavanje krvi i reagensa, 4 – inkubacija na 37 °C, 5 – inicijacija agregacije dodatkom induktora, 6 – iskazivanje rezultata kao površina ispod krivulje.

Postupak određivanja statistički značajne antiagregacijske koncentracije

Mjeri se agregacija kontrolnog uzorka bez dodatka ekstrakta (AUC_0) i koncentracijskog niza ekstrakata (AUC) na dvije elektrode. Najmanje razrjeđenje uzorka, koje pokazuje razliku agregacije u odnosu na kontrolni uzorak veću od 5%, uzima se kao statistički značajna antiagregacijska koncentracija koja se izražava kao ekvivalent kvercetina na osnovi masene koncentracije suhog ostatka ekstrakta. Ukoliko ni kod jednog razrjeđenja ne postoji statistički značajna razlika, smatra se da ekstrakt ne pokazuje antiagregacijsko djelovanje. Statistička analiza provedena je primjenom Studentovog t -testa. (Bojić i sur., 2011).

4. REZULTATI

U nastavku su prikazani rezultati spektrofotometrijskog određivanja flavonoida i fenolnih kiselina te antiagregacijskog učinka ekstrakata 5 različitih biljnih uzoraka: paprene metvice, mravinca te tri uzorka ružmarina koji se međusobno razlikuju po nalazištu ili biljnim organima sadržanima u uzorku.

4.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA

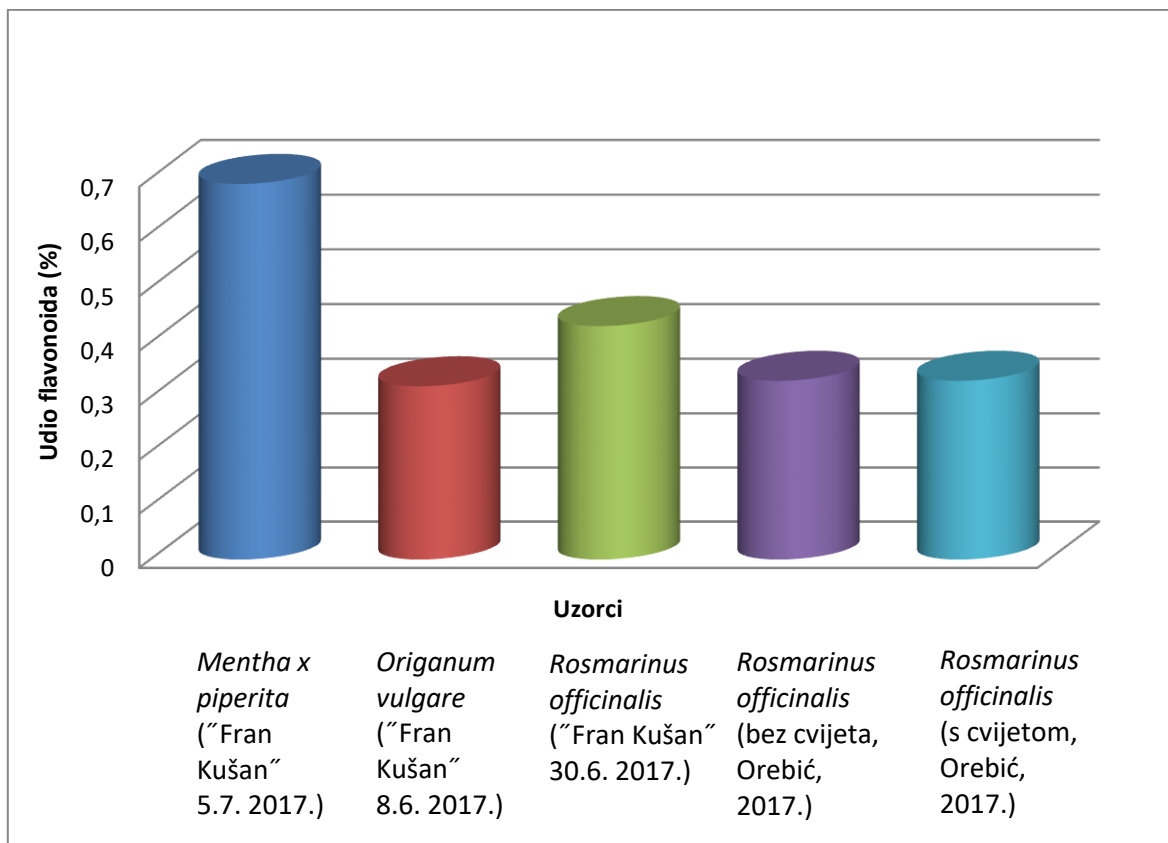
Količina flavonoida i fenolnih kiselina u svim uzorcima je spektrofotometrijski određena tri puta. Dobiveni rezultati prikazani su u postocima kao srednja vrijednost i standardna devijacija (Tablica 2.).

Tablica 2. Udio (%) flavonoida i fenolnih kiselina u uzorcima odabranih biljnih vrsta porodice Lamiaceae

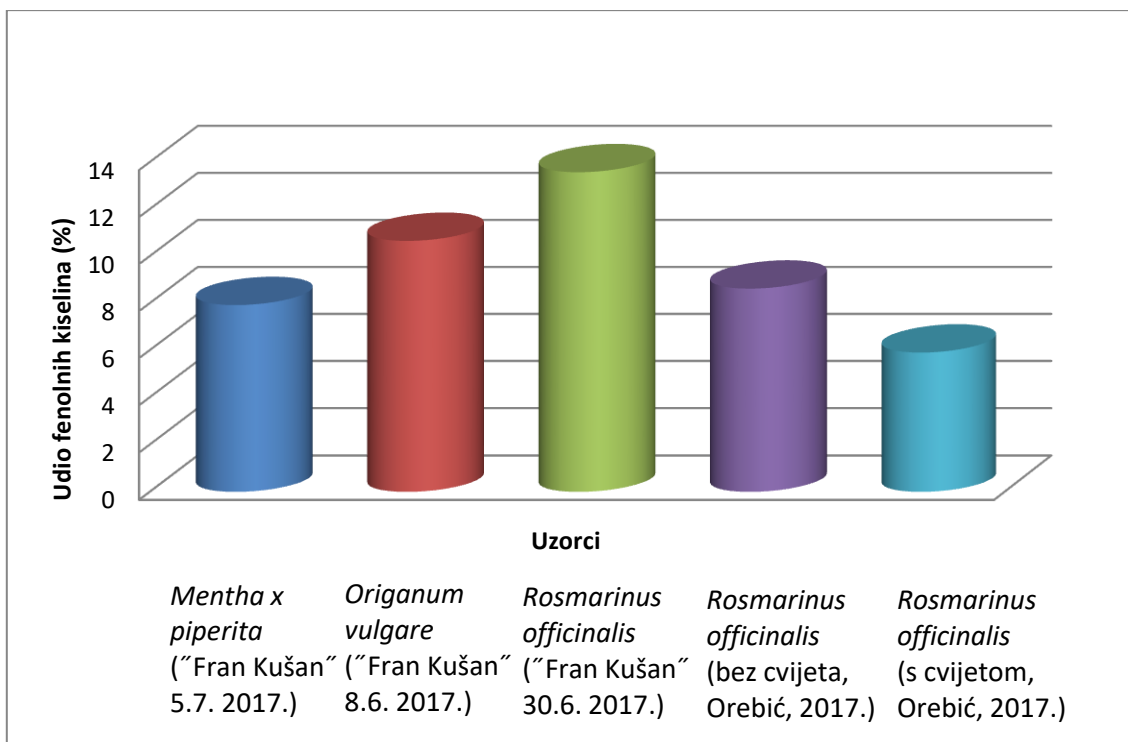
Biljna vrsta, nalazište, datum skupljanja	$w_{flavonoida}(\% \pm SD, n = 3)$	$w_{fenolnih\ kiselina}(\% \pm SD, n = 3)$
<i>Mentha x piperita</i> ("Fran Kušan" 5.7. 2017.)	0,69 ± 0,01	7,92 ± 0,06
<i>Origanum vulgare</i> ("Fran Kušan" 8.6. 2017.)	0,32 ± 0,01	10,65 ± 0,48
<i>Rosmarinus officinalis</i> ("Fran Kušan" 30.6. 2017.)	0,43 ± 0,07	13,57 ± 0,26
<i>Rosmarinus officinalis</i> (bez cvijeta, Orebić, 2017.)	0,33 ± 0,00	8,62 ± 0,28
<i>Rosmarinus officinalis</i> (s cvijetom, Orebić, 2017.)	0,33 ± 0,00	5,90 ± 0,05

Sadržaj flavonoida u uzorku paprene metvice iznosio je 0,69%, u uzorku mravinca 0,32%, dok je u uzorcima ružmarina varirao od 0,33 do 0,43%, s tim da rezultati mjerenja dvaju uzoraka ružmarina iz dalmatinskog područja nisu pokazali razliku u količini flavonoida (Slika 15.). Najviše fenolnih kiselina pronađeno je u uzorku ružmarina iz Farmaceutskog

botaničkog vrta „Fran Kušan“. U ostalim uzorcima ružmarina količina fenolnih kiselina bila je 8,62%, odnosno 5,90%, ovisno o odsutnosti ili prisutnosti cvijeta u uzorku. U uzorku mravinca određeno je 10,65% fenolnih kiselina, dok je u uzorku metvice određeno 7,92% (Slika 16.).



Slika 15. Grafički prikaz udjela (%) flavonoida u uzorcima odabranih biljnih vrsta porodice Lamiaceae



Slika 16. Grafički prikaz udjela (%) fenolnih kiselina u uzorcima odabranih biljnih vrsta porodice Lamiaceae

4.2. ANTIAGREGACIJSKI UČINAK EKSTRAKATA BILJNIH VRSTA

Antiagregacijski učinak odabranih biljnih vrsta porodice usnatica, odnosno njihovih ekstrakata i pripadajućih serija razrjeđenja, određivan je metodom impedancijske agregometrije. Antiagregacijski učinak prikazan je statistički značajnom antiagregacijskom koncentracijom (Tablica 3.).

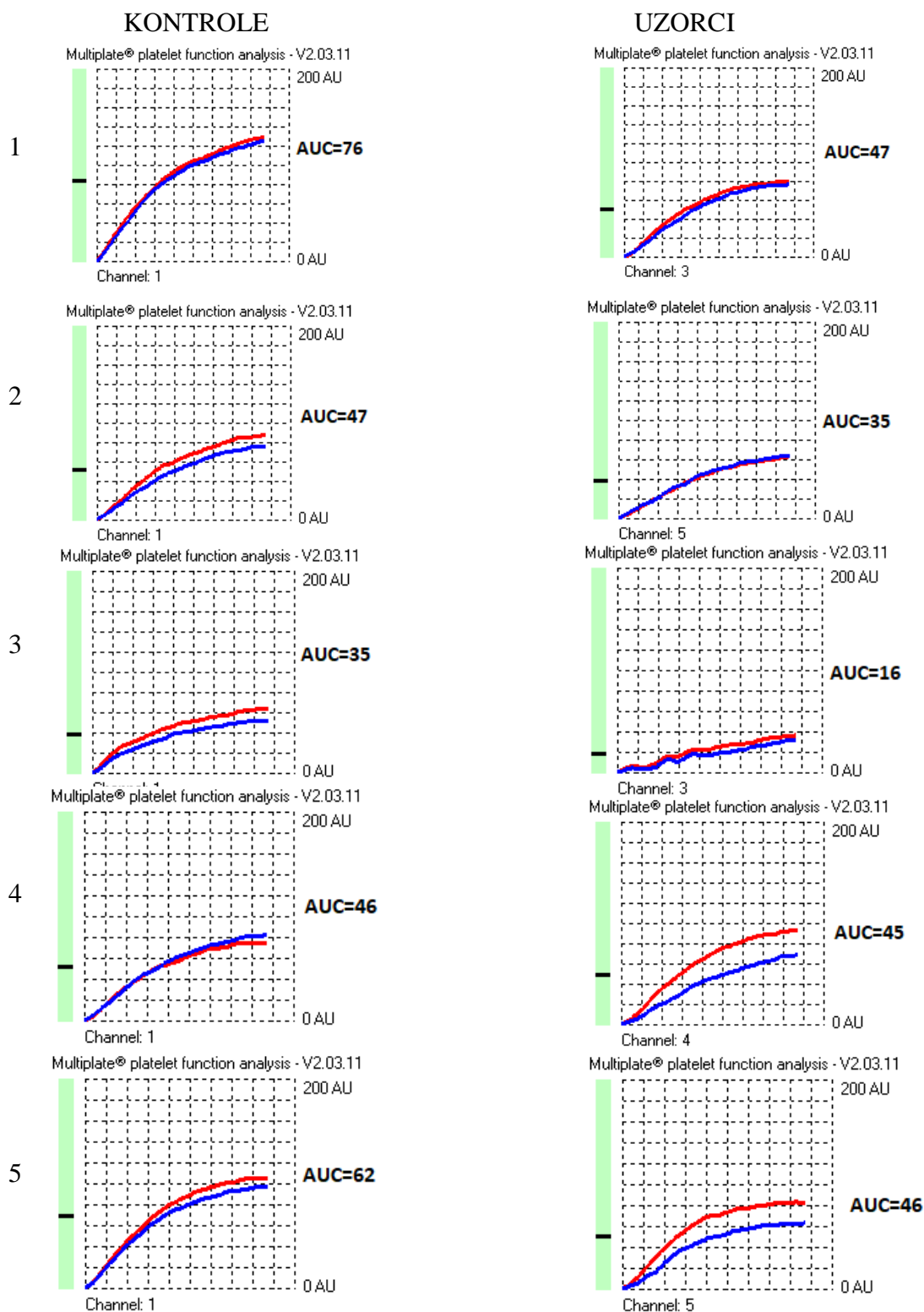
Tablica 3. Statistički značajna antiagregacijska koncentracija u odabranim biljnim vrstama porodice Lamiaceae

Biljka, nalazište i datum skupljanja	Statistički značajna antiagregacijska koncentracija ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$)	p^*
<i>Mentha x piperita</i> ("Fran Kušan" 5.7. 2017.)	20,68	0,0005
<i>Origanum vulgare</i> ("Fran Kušan" 8.6. 2017.)	2,07	0,0003
<i>Rosmarinus officinalis</i> ("Fran Kušan" 31.6. 2017.)	20,68	0,0023
<i>Rosmarinus officinalis</i> (bez cvijeta, Orebić, 2017.)	20,68	0,0009
<i>Rosmarinus officinalis</i> (s cvijetom, Orebić, 2017.)	2,07	0,0106

*Rezultati ispitivanja su statistički obrađeni Studentovim t -testom. Kao statistički značajna antiagregacijska koncentracija odabrana je najmanja koncentracija za koju je Studentov t -test pokazao p vrijednost manju od 0,05, što znači da se agregacija kod te koncentracije statistički razlikuje od agregacije kontrole.

Najbolji antiagregacijski učinak pokazali su ekstrakti mravinca i ružmarina s cvijetom skupljenog u Orebiću, za koje je izmjerena statistički značajna antiagregacijska koncentracija u iznosu od 2,07 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Uzorci paprene metvice, ružmarina skupljenog u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ i ružmarina bez cvijeta skupljenog u Orebiću su pokazali slabiji antiagregacijski učinak uz vrijednost statistički značajne antiagregacijske koncentracije u iznosu od 20,68 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

U nastavku su rezultati ispitivanja agregacije metodom impedancijske agregometrije grafički prikazani kao ovisnost agregacije (os y) o vremenu (os x), a površina ispod krivulje (AUC) služi kao arbitrarna mjera, tj. indikator agregacije (Slika 17.). Kod svih uzoraka obuhvaćenih ispitivanjem, izmjerene su veće AUC vrijednosti za kontrole u odnosu na uzorke koji sadrže ekstrakte.



Slika 17. Grafički prikaz ovisnosti agregacije o vremenu; prvi stupac prikazuje rezultate mjerenja kontrola koje ne sadrže uzorak, a drugi stupac rezultate mjerenja uzoraka pojedine biljne vrste. 1- *M. x piperita*, "Fran Kušan", 2- *O. vulgare*, "Fran Kušan", 3- *R. officinalis*, "Fran Kušan", 4- *R. officinalis* (bez cvijeta), "Orebić", 5- *R. officinalis* (s cvijetom), "Orebić"

5. RASPRAVA

Ljekovite biljke ili njihovi dijelovi koji se koriste u terapijske svrhe su izrazito složeni sustavi. Sadrže velik broj različitih sastavnica. Ponekad je sinergističko djelovanje više tvari odgovorno za pozitivne učinke pojedine biljne vrste te se u takvim slučajevima treba koristiti biljni pripravak, a ponekad se takvi učinci pripisuju isključivo jednoj sastavnici ili njih nekoliko. Ukoliko se dokaže takva sastavnica, ona se može izolirati i primjenjivati u terapijske svrhe bez ostalih primjesa. Najbolji primjer takve primjene biljnih sastavnica su upravo flavonoidi hesperidin i diosmin, što je već bilo spomenuto u uvodnom dijelu rada. Osim izolacijom, određene prirodne supstancije mogu se dobiti i kemijskom sintezom, što može, ali i ne mora biti isplativije. Stoga, iako se radi o biljnim sastavnicama, moguća je njihova industrijska proizvodnja u velikim količinama.

U ovom istraživanju, najprije je bio određen udio flavonoida i fenolnih kiselina u pojedinim uzorcima kako bi se saznalo koliko istraživane biljne vrste uistinu sadrže tvari za koje je pretpostavljeno da bi mogle imati antiagregacijski učinak. Uz navedeno, ispitivani su i određeni čimbenici koji mogu utjecati na promjenljivost biljnog sastava, kao što je geografsko podrijetlo; na način da je uspoređivan sadržaj flavonoida i fenolnih kiselina u ružmarinu uzgojenom u Farmaceutskom botaničkom vrtu u Zagrebu i samoniklo raslog na poluotoku Pelješcu. Određeno je da ružmarin, uzgojen u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ sadrži više aktivnih sastojaka, točnije flavonoida i fenolnih kiselina od ružmarina samoniklo raslog na Orebiću. Posredno su ispitane razlike u udjelu navedenih sastojaka među pojedinim dijelovima biljke tako što su u ispitivanje bili uzeti uzorak s cvijetom i bez cvijeta biljke uzgojene na istom geografskom području. Na temelju usporedbe rezultata ispitivanja udjela fenolnih kiselina u uzorku ružmarina skupljenog u Orebiću s cvijetom te bez cvijeta, možemo zaključiti da cvijet ružmarina, nije bogat fenolnim kiselinama.

Sadržaj flavonoida u uzorku nam samo djelomično govori o vrijednosti tog uzorka. Logično je proizvesti zaključak da će veća količina tih biljnih sastavnica proizvesti snažnije antiagregacijsko djelovanje, no to nije nužno tako. Budući se radi o velikom broju različitih spojeva, pojedini flavonoidi različito pridonose antiagregacijskom učinku te ovisno o količini pojedinog i/ili više flavonoida i/ili o njihovom međusobnom omjeru, pokazuju željeno djelovanje. No, poznavajući točan udio flavonoida u pojedinom uzorku, moguće je usporediti ovisnost antiagregacijskog djelovanja o sadržaju flavonoida te pretpostaviti koji flavonoidi

i/ili smjese flavonoida prisutne u biljnom uzorku djeluju potentnije na agregaciju trombocita. Glavni nedostatak spomenutih postupaka je neselektivnost. Istraživanje ne sadržava niti jednu metodu koja bi omogućila jednoznačnu identifikaciju pojedinih flavonoida. Stoga nije moguće potencijalno antiagregacijsko djelovanje pripisati pojedinom flavonoidu, jer se ne može sa sigurnošću utvrditi koji je flavonoid najzastupljeniji u uzorku. Moguće je samo referirati se na literaturne podatke, a kao što je pokazano u istraživanju, biljni sastav uvelike varira ovisno o brojnim čimbenicima te se na temelju literaturnih podataka ne može jednoznačno utvrditi sastav ovako složenih smjesa.

Kao što smo već spomenuli, pojedini flavonoidi imaju jači učinak na agregaciju od drugih. Zato je moguće da određena biljka sadrži sveukupno manje flavonoida, a pokazuje jače djelovanje. Najbolji primjer toga je mravinac. Zelen mravinca sadrži samo 0,32% flavonoida, ali ima izrazito izražen antiagregacijski učinak, zbog čega se može pretpostaviti da flavonoidi sadržani u tom uzorku djeluju vrlo potentno na inhibiciju agregacije trombocita. Moguć je i obrnuti slučaj, u kojem uzorak sadrži mnogo flavonoida, a ima slabo djelovanje na hemostazu. Takav slučaj prisutan je kod listova paprene metvice, koji sadrže čak 0,69% flavonoida, ali nemaju snažan antiagregacijski učinak.

Glavni cilj ovog istraživanja je utvrditi imaju li pojedine biljke antiagregacijsko djelovanje. Antiagregacijsko djelovanje prikazano je na dva načina, kao statistički značajna antiagregacijska koncentracija koja predstavlja najmanju koncentraciju, odnosno najveće razrjeđenje ekstrakta koje još uvijek pokazuje statistički značajan antiagregacijski utjecaj. Što je niža koncentracija, to je jače inhibicijsko djelovanje na agregaciju. Drugi način prikaza predstavljaju grafovi ovisnosti agregacije o vremenu. Iz dobivene krivulje, izračuna se površina ispod krivulje koja služi kao arbitrarna jedinica za agregaciju. Što je ta površina veća, to je agregacija trombocita veća. Stoga, oni uzorci čijom analizom se dobije manja površina, imaju jači antiagregacijski učinak. Točnije, antiagregacijski učinak će biti to jači, što je veća razlika između AUC kontrole i AUC ispitivanog uzorka. Dokazano je da svi ispitani biljni uzorci u određenoj mjeri djeluju inhibicijski na agregaciju trombocita, među kojima se posebno ističu mravinac i uzorak ružmarina s cvijetom skupljen u Orebiću 2017. godine.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da su biljke porodice Lamiaceae bogate flavonoidima i fenolnim kiselinama. Različiti čimbenici, poput klimatskih uvjeta, odnosno geografskog podrijetla utječu na sadržaj i udio spomenutih sastavnica. Tako su se bogatijima pokazale biljke ružmarina uzgojene u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta u odnosu na samonikli ružmarin skupljen u Orebiću na poluotoku Pelješcu. Nadalje, razlike u udjelu flavonoida i/ili fenolnih kiselina mogu se pronaći među različitim biljnim organima. Na temelju dobivenih podataka, zaključuje se da listovi ružmarina sadrže veću količinu flavonoida i fenolnih kiselina od cvjetova.

Ovo istraživanje je pokazalo da biljane vrste *Mentha x piperita*, *Origanum vulgare* i *Rosmarinus officinalis* imaju potencijalni inhibicijski učinak na agregaciju trombocita. Flavonoidi kao biološki aktivni spojevi pridonose tom učinku. Ne može se sa sigurnošću utvrditi radi li se o učinku pojedinog flavonoida ili o sinergističkom djelovanju više flavonoidnih spojeva. Ovo otkriće može poslužiti kao temelj za daljnja ispitivanja specifičnih antiagregacijskih učinaka pojedinih flavonoida, odnosno njihove smjese prisutne u ispitivanim biljkama. Klinička primjenjivost istraživanja nije znatna. No, budući se radi o veoma popularnom biomedicinskom području koje uključuje bolesti vodeće uzročnike smrti sadašnjice, daljnja istraživanja koja će se baviti ovom temom je veoma realno za očekivati, a u skladu s time i nove, preciznije i opširnije informacije o učincima pojedinih spojeva, što bi u konačnici moglo dovesti do njihove kliničke primjene. Otkriće prirodnih sastavnica, poput flavonoida, s dokazanim, o dozi ovisnim, potentnim antiagregacijskim djelovanjem predstavljalo bi velik hit u liječenju i prevenciji kardiovaskularnih incidenata te bi takvi prirodni spojevi sigurno imali svoje mjesto na tržištu lijekova.

7. LITERATURA

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem*, 2006, 99, 191-203.

Bojić M, Debeljak T, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutr J*, 2011, 10, 73-81.

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

Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol Derivaten in Drogen. *Arch Pharm*, 1960, 293, 1033-1042.

Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated Dietary Flavonoid Intake and Major Food Sources of U.S. Adults. *J Nutr*, 2007, 137, 1244-1252.

Domac R, Flora Hrvatske priručnik za određivanje bilja. Zagreb, Školska knjiga, 2002, str. 290-301.

European Scientific Cooperative on Phytotherapy. ESCOP monographs: The Scientific foundation for herbal medicinal products, 2nd ed. Exeter Stuttgart-New York, ESCOP Thieme, 2003, str 329-333, 337-339, 429-433.

European Pharmacopoeia, Fifth edition, Volumen 2. Strasbourg, Council of Europe, 2004, str. 1990.

Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazon J. Phenolic acids. U: Natural products. Ramawat KG, Mérillon JM, urednici, Berlin, Heidelberg, Springer, 2013, str. 1952-1967.

Grić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb, August Cesarec, 1986, str. 263, 272-273.

Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-Garcia O, Vicente V, Rivera J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A₂ receptor. *J Thromb Haemost*, 2005, 3, 369–376.

Gursky Z, Zlatna knjiga ljekovitog bilja. Zagreb, Nakladni zavod matice Hrvatske, 1999, str. 365-368., 377-378., 473-475.

Gutiérrez-Grijalva E P, Picos-Salas M A, Leyva-López N, Criollo-Mendoza M S, Vazquez-Olivo G, Basilio Heredia J. Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. *Plants*, 2018, 7, str. 2-3.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2006, str. 456-468.

Huang WY, Cai YZ. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. *Nutr Cancer*, 2010, 62, 1–20.

- Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenböck G, Schnitzler JP. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot*, 1998, 49, 953–965.
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 591-599.
- Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd, Srpska školska knjiga, 2004, str. 126-128, 146-151.
- Kuštrak D, Farmakognozija fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing – tehnička knjiga, 2005, str. 228-231, 284-288, 308-309, 408-409.
- Lamiaceae, plant family, 2015., <https://www.britannica.com/plant/Lamiaceae>, pristupljeno: 3. 4. 2018.
- Marković S, Fitoaromaterapija, Zagreb, Centar cedrus, 2005, str 240-244.
- Mozaffarian D, Wu JHY. Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health A Review of Emerging Biologic Pathways. *J Am Heart Assoc*, 2018, 122, 369-384.
- Nervo A, Mrkonjić R. Rizični čimbenici za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Hrvatski časopis za javno zdravstvo, 2017, 13, 75-80.
- Pahlow M, Velika knjiga ljekovitog bilja. Ljubljana – Zagreb, Cankarjeva založba, 1989, str. 198-202, 273-274.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, 2016, 5, 1-15.
- Paniccia R, Priora R, Alessandrello Liotta A, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*, 2015, 11, 133-148.
- Perez-Vizcaino F, Fraga CG. Research trends in flavonoids and health. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 646, 107-112.
- Sažetak opisa svojstava lijeka, 2014., <https://mediately.co/hr/drugs/DZoiF0AYg202H730VwZmojzme7d/detraleX-500-mg-filmom-oblozene-tablete#packagings> , pristupljeno: 19. 4. 2018.
- Slika mravinca, 2017., <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2015/06/origano-24.jpg> , pristupljeno 11. 4. 2018.
- Slika paprene metvice, 2016., <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2016/02/paprena-metvica-1.jpg> , pristupljeno 5. 4. 2018.
- Slika ružmarina, 2017., <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2014/10/ruzmarin-1.jpg> , pristupljeno 11. 4. 2018.

Toplak Galle K, Domaće ljekovito bilje. Zagreb, Mozaik knjiga, 2005, str. 18-19, 162, 176-177, 202-203.

8. SAŽETAK/SUMMARY

SAŽETAK

Bolesti krvožilnog sustava su vodeći uzročnici smrti i invaliditeta u svijetu. Kako bi se spriječili kardiovaskularni incidenti, koriste se brojni lijekovi, među kojima i inhibitori agregacije trombocita čija je glavna uloga onemogućavanje stvaranja i rasta funkcionalnog tromba. Pronađeno je da biljne vrste *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L. i *Rosmarinus officinalis* L. koje pripadaju porodici Lamiaceae posjeduju antiagregacijski učinak.

U ovom radu spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru su kvantitativno analizirani flavonoidi i fenolne kiseline prisutne u uzorcima paprene metvice, mravinca i tri uzorka ružmarina koji se međusobno razlikuju po geografskom podrijetlu i sadržanim biljnim organima. U paprenoj metvici je određeno 0,69% flavonoida i 7,92% fenolnih kiselina, u mravincu 0,32% flavonoida i 10,65% fenolnih kiselina, a sadržaj flavonoida u uzorcima ružmarina varirao je od 0,33 do 0,43%, dok je fenolnih kiselina određeno od 5,90 do 13,57%. Uzorci ružmarina uzgojeni u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ pokazali su veći sadržaj aktivnih sastojaka u odnosu na samonikle biljke iz Orebića, a također je pronađeno da su listovi ružmarina bogatiji flavonoidima i fenolnim kiselinama od cvjetova.

Nadalje, proučavan je antiagregacijski učinak navedenih biljaka metodom impedancijske agregometrije na Multiplate[®] uređaju prema generičkom postupku proizvođača instrumenta. Agregacija je bila potaknuta ADP-om. Rezultati su statistički obrađeni Studentovim *t*-testom te prikazani kao statistički značajna antiagregacijska koncentracija i grafički krivuljom ovisnosti agregacije o vremenu. Pronađeno je da najbolje antiagregacijsko djelovanje imaju ekstrakti mravinca i uzorka s cvijetom skupljenog u Orebiću, a njihova statistički značajna antiagregacijska koncentracija je iznosila 2,07 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Nešto slabije antiagregacijsko djelovanje su pokazali uzorci paprene metvice, ružmarina uzgojenog u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ i ružmarina bez cvijeta skupljenog u Orebiću, a statistički značajna antiagregacijska koncentracija iznosila je 20,68 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

SUMMARY

Cardiovascular diseases are leading cause of death and disability in the world. In order to prevent cardiovascular incidents, many drugs are used, including platelet aggregation inhibitors which main role is to stop generation and growth of functional thrombus. It is found that plant species *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. which belong to Lamiaceae's family have an anti-aggregation effect.

In this thesis flavonoids and phenolic acids present in the samples of peppermint, oregano and three samples of rosemary which differs by geographic origin and plant organs included, were quantified using spectrophotometric method established by Christ and Müller. It was measured that peppermint has 0.69% of flavonoids and 7.92% of phenolic acids, oregano has 0.32% of flavonoids and 10.65% of phenolic acids and in three samples of rosemary amount of flavonoids varies between 0.33 and 0.43% and phenolic acids between 5.90 and 13.57%. Samples of rosemary cultivated in Pharmaceutical botanical garden „Fran Kušan“ are found to have more active compounds than plants from Orebić and it is also seen that leaves have more flavonoids and phenolic acids than flowers.

Furthermore, antiaggregatory effect of plant extracts was studied by impedance aggregometry on Multiplate[®] Analyze. Aggregation was induced by ADP. Results were statistically assessed by Student's t-test and presented as statistically significant anti-aggregation concentration and aggregation-time graph. It is found that the best antiaggregatory effects have extracts of oregano and rosemary with flowers from Orebić with statistically significant antiaggregatory concentration of 2.07 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Lesser antiaggregatory effects are determined for samples of peppermint, rosemary cultivated in Pharmaceutical botanical garden „Fran Kušan“ and rosemary without flowers collected in Orebić, so their statistically significant antiaggregatory concentrations are 20.68 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ for each sample.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Određivanje količine flavonoida i fenolnih kiselina te antiagregacijskog učinka u vrstama *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L. i *Rosmarinus officinalis* L.

Franjo Josip Marelja

SAŽETAK

Bolesti krvožilnog sustava su vodeći uzročnici smrti i invaliditeta u svijetu. Kako bi se spriječili kardiovaskularni incidenti, koriste se brojni lijekovi, među kojima i inhibitori agregacije trombocita čija je glavna uloga onemogućavanje stvaranja i rasta funkcionalnog tromba. Pronađeno je da biljne vrste *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L. i *Rosmarinus officinalis* L. koje pripadaju porodici Lamiaceae posjeduju antiagregacijski učinak. U ovom radu spektrofotometrijskom metodom prema Christu i Mülleru su kvantitativno analizirani flavonoidi i fenolne kiseline prisutne u uzorcima paprene metvice, mravinca i tri uzorka ružmarina koji se međusobno razlikuju po geografskom podrijetlu i sadržanim biljnim organima. U paprenoj metvici je određeno 0,69% flavonoida i 7,92% fenolnih kiselina, u mravincu 0,32% flavonoida i 10,65% fenolnih kiselina, a sadržaj flavonoida u uzorcima ružmarina varirao je od 0,33 do 0,43%, dok je fenolnih kiselina određeno od 5,90 do 13,57%. Uzorci ružmarina uzgojeni u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ pokazali su veći sadržaj aktivnih sastojaka u odnosu na samonikle biljke iz Orebića, a također je pronađeno da su listovi ružmarina bogatiji flavonoidima i fenolnim kiselinama od cvjetova. Nadalje, proučavan je antiagregacijski učinak navedenih biljaka metodom impedancijske agregometrije na Multiplate® uređaju prema generičkom postupku proizvođača instrumenta. Agregacija je bila potaknuta ADP-om. Rezultati su statistički obrađeni Studentovim t-testom te prikazani kao statistički značajna antiagregacijska koncentracija i grafički krivuljom ovisnosti agregacije o vremenu. Pronađeno je da najbolje antiagregacijsko djelovanje imaju ekstrakti mravinca i uzorka s cvijetom skupljenog u Orebiću, a njihova statistički značajna antiagregacijska koncentracija je iznosila 2,07 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Nešto slabije antiagregacijsko djelovanje su pokazali uzorci paprene metvice, ružmarina uzgojenog u Farmaceutskom botaničkom vrtu „Fran Kušan“ i ružmarina bez cvijeta skupljenog u Orebiću, a statistički značajna antiagregacijska koncentracija iznosila je 20,68 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

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

Rad sadrži: 47 stranica, 17 grafičkih prikaza, 3 tablice i 32 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., flavonoidi, fenolne kiseline, kvantitativna analiza, antiagregacijsko djelovanje

Mentor: **Dr. sc. Željko Maleš**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Željko Maleš**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Mirza Bojić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Biljana Nigović, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids and determination of anti-aggregation effect in species *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L. i *Rosmarinus officinalis* L.

Franjo Josip Marelja

SUMMARY

Cardiovascular diseases are leading cause of death and disability in the world. In order to prevent cardiovascular incidents, many drugs are used, including platelet aggregation inhibitors which main role is to stop generation and growth of functional thrombus. It is found that plant species *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. which belong to Lamiaceae's family have an anti-aggregation effect. In this thesis flavonoids and phenolic acids present in the samples of peppermint, oregano and three samples of rosemary which differs by geographic origin and plant organs included, were quantified using spectrophotometric method established by Christ and Müller. It was measured that peppermint has 0.69% of flavonoids and 7.92% of phenolic acids, oregano has 0.32% of flavonoids and 10.65% of phenolic acids and in three samples of rosemary amount of flavonoids varies between 0.33 and 0.43% and phenolic acids between 5.90 and 13.57%. Samples of rosemary cultivated in Pharmaceutical botanical garden „Fran Kušan“ are found to have more active compounds than plants from Orebić and it is also seen that leaves have more flavonoids and phenolic acids than flowers. Furthermore, antiaggregatory effect of plant extracts was studied by impedance aggregometry on Multiplate® Analyze. Aggregation was induced by ADP. Results were statistically assessed by Student's t-test and presented as statistically significant anti-aggregation concentration and aggregation-time graph. It is found that the best antiaggregatory effects have extracts of oregano and rosemary with flowers from Orebić with statistically significant antiaggregatory concentration of 2.07 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Lesser antiaggregatory effects are determined for samples of peppermint, rosemary cultivated in Pharmaceutical botanical garden „Fran Kušan“ and rosemary without flowers collected in Orebić, so their statistically significant antiaggregatory concentrations are 20.68 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ for each sample.

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

Thesis includes: 47 pages, 17 figures, 3 tables and 3w references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Mentha x piperita* L., *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., flavonoids, phenolic acids, quantitative analysis, antiaggregation effect

Mentor: **Željko Maleš, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željko Maleš, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

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

Biljana Nigović, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2017.