

Utjecaj flavanona na agregaciju trombocita potaknutu adrenalinom

Horvat, Regina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:163:977955>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-29**



Repository / Repozitorij:

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



Regina Horvat

**Utjecaj flavanona na agregaciju trombocita
potaknutu adrenalinom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija lijekova, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirze Bojića.

Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Bojiću na stručnom vodstvu i pomoći i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada te dr. sc. Ivani Babić uz čije je mentorstvo proveden eksperimentalni dio rada na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu.

Iznimno sam zahvalna svojoj predivnoj obitelji, Igoru i najboljim prijateljima na beskonačnoj podršci, motivaciji i strpljenju kroz svih pet godina. Zahvalna sam kolegama, ujedno i novim prijateljima, na međusobnom bodrenju uz koje je sve bilo lakše.

SADRŽAJ

1.	Uvod.....	1
1.1.	Značenje i mehanizam agregacije trombocita.....	2
1.1.1.	Hemostaza	2
1.1.2.	Induktori agregacije trombocita.....	4
1.2.	Kardiovaskularne bolesti.....	7
1.3.	Antiagregacijska terapija	9
1.4.	Flavonoidi.....	12
1.4.1.	Francuski i azijski paradoks	15
2.	Obrazloženje teme.....	16
3.	Materijali i metode	18
3.1.	Materijali.....	19
3.1.1.	Uzorci i standardi.....	19
3.1.2.	Kemikalije	20
3.1.3.	Instrumenti i laboratorijski pribor.....	20
3.2.	Metode	22
3.2.1.	Ispitivanje agregacije trombocita.....	22
3.2.2.	Postupak provedbe testa agregacije trombocita.....	23
3.2.2.1.	ADP test.....	23
3.2.2.2.	ASPI ASA test	24
3.2.3.	Određivanje minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida (MINaAC)	25
4.	Rezultati	27
5.	Rasprava	34
6.	Zaključak	40
7.	Literatura	42
8.	Sažetak.....	48
9.	Prilog	51
10.	Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card	

Popis kratica

ADP	adenozin difosfat
ASK	acetilsalicilna kiselina
ATP	adenozin trifosfat
AU	arbitrarna jedinica, engl. <i>arbitrary unit</i>
AUC	površina ispod krivulje, engl. <i>area under curve</i>
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
COX -1	ciklooksigenaza 1
DAG	diacilglicerol
DDK	dobrovoljni davatelji krvi
DMSO	dimetilsulfoksid
GP	glikoprotein
IP3	inozitol-1,4,5-trifosfat
KVB	kardiovaskularne bolesti
LDL	lipoproteini niske gustoće, engl. <i>low density lipoprotein</i>
MINaAC	minimalna antiagregacijska koncentracija
PI3K	fosfoinozitol-3-kinaza, engl. <i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKC	protein-kinaza C
PLC	fosfolipaza C, engl. <i>phospholipase C</i>
ROS	reaktivni kisikovi spojevi, engl. <i>reactive oxygen species</i>
SAR	odnos strukture i aktivnosti, engl. <i>structure-activity relationship</i>
SCORE	sistematska procjena koronarnog rizika, engl. <i>systematic coronary risk evaluation</i>
TRAP-6	heksapeptidni aktivator trombinskog receptora, engl. <i>thrombin receptor activator peptide 6</i>
TxA2	tromboksan A2
VASP	fosfoprotein stimuliran vazodilatatorom, engl. <i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
vWf	von Willebrandov faktor

1. Uvod

1.1. Značenje i mehanizam agregacije trombocita

1.1.1. Hemostaza

Trombociti ili krvne pločice su 1-3 μm veliki stanični fragmenti bez jezgre, a na laboratorijskom nalazu kompletne krvne slike njihov referentni interval iznosi $150 - 350 \times 10^9/\text{L}$ krvi. Nastaju u koštanoj srži, iz hematopoetske matične stanice, trombopoezom koja dovodi do nastanka megakariocita. Sam megakariocit tvori brojne izdanke (protrombocite) koji sežu do lumena sinusoidalnih krvnih žila koštane srži nakon čega se trombociti cijepaju s krajeva protrombocita izravno u krv. Životni vijek trombocita u krvi je 9 do 12 dana. Iako nemaju jezgru, sadrže različite organele (mitohondrije i dijelove Golgijeva aparata), a iz površine se izbočuje otvoreni sustav kanala gdje se odlaže sadržaj granula čiji je sadržaj povezan s njihovom ulogom (Aumuller i sur., 2018).

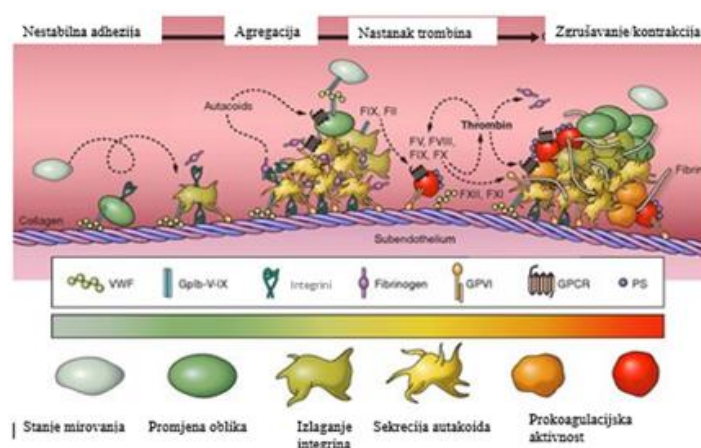
Trombocitne granule dijele se na α -granule koje sadrže specifične bjelančevine za adheziju, čimbenike zgrušavanja, citokine i inhibitore fibrinolitičkih sustava, te β -granule u kojima je sadržan serotonin potreban za vazokonstrikciju. Preostala endoplazmatska mrežica tvori zatvorenu mrežu kanala gdje se nakupljaju ioni kalcija (Aumuller i sur., 2018).

U novije vrijeme otkrivene su uloge trombocita u imunom odgovoru na mikrobiološku infekciju, pri čemu potiču upalni odgovor, ali u nekim slučajevima dovode i do diseminirane vaskularne koagulacije i sepse. Istražena je i njihova uloga u angiogenezi što naposljetku dovodi do rasta tumora, a uz pomoć mehanizama koji se još istražuju, trombociti potpomažu i nastanak metastaza. Ipak, prvo otkrivena i osnovna uloga trombocita jest ona u hemostazi (Leslie, 2010).

Hemostaza predstavlja skup međusobno povezanih biokemijskih reakcija koje dovode do zaustavljanja krvarenja koje nastaje pri oštećenju krvne žile, održavaju normalnu protočnost krvi i sudjeluju u uklanjanju krvnog ugruška nakon popravka krvne žile. Iako se hemostaza tradicionalno dijeli na onu primarnu koja obuhvaća vazokonstrikciju i nastanak trombocitnog čepa i sekundarnu u kojoj nastaje fibrinska mreža kao posljedica koagulacijske kaskade, novija istraživanja ukazuju na jedan dinamičniji i međusobno isprepleten proces između trombocita, komponenti koagulacijske kaskade i komponenti stijenke krvne žile (Versteeg i sur., 2013).

Kada je endotel neoštećen, trombociti se nalaze u svom neaktivnom stanju koje karakterizira diskoidni oblik i izostanak adhezije za endotel krvne žile zahvaljujući specifičnom glikoproteinskom omotaču koji ne omogućava prijanjanje uz normalni endotel. Trombociti se aktiviraju uslijed oštećenja žilnog endotela unutar nekoliko sekundi nakon čega dolazi do

promjene njihovog oblika i poprimanja svojstva adhezije (slika 1.). Diskoidni trombociti kroz interakciju adhezivnih glikoproteinskih receptora s proteinima izvanstaničnog matriksa koji postaju dostupni nakon ozljede, von Willebrandova faktora (VWF) preko GP Ia-V-IX receptora i kolagena preko GP VI receptora, prijanjaju na mjesto ozljede. VWF je sadržan u α -granulama endotelnih stanica i trombocita, a nakon povezivanja s trombocitima ima ulogu restrukturiranja aktinskog citoskeleta pri čemu oni postaju okrugli i formiraju pseudopodije. Potaknuto kalcijem koji kao sekundarni glasnik potpomaže unutarstanične procese, iz granula počinje lučenje autakoida kao što su tromboksan A2 i ADP koji posljedično aktiviraju trombocite u neposrednoj blizini i potiču njihovu agregaciju. Slijedi izlaganje i aktivacija integrina na površini trombocita koje je bitno za stabilno vezanje trombocita na endotel krvne žile ili za rastući ugrušak odnosno prethodno aktivirane trombocite. Najviše zastupljen integrin na površini jest GPIIb/IIIa, a njegova posebnost je mogućnost prijenosa signala iz vanjskog okoliša prema unutrašnjosti i obrnuto. Na mjestu ozljede se aktivira sve više trombocita koji privlače dodatne trombocite iz blizine koji prijanjaju na postojeće i tako agregacijom nastaje trombocitni čep koji je dovoljan za zaustavljanje krvarenja pri manjim ozljedama krvnih žila. Prokoagulacijski trombociti stvaraju membranu bogatu fosfatidilserinom čime potiču stvaranje određenih komponenti koagulacijske kaskade - tenaznog kompleksa i kompleksa protrombinaze što dovodi do velike proizvodnje trombina. Trombin ima glavnu ulogu u aktivaciji koagulacijskih faktora, ali i samih trombocita. Brojni trombociti počinju se povezivati preko fibrinogenskih mostova, a kasnije i preko fibrinskih niti (Versteeg i sur., 2013).



Slika 1. Faze aktivacije trombocita i nastanka trombocitnog čepa (preuzeto i prilagođeno prema Versteeg i sur., 2013).

Za nastanak trombina, a posljedično i fibrina koji stabilizira trombocitni čep i pospješuje nastanak krvnog ugruška, potrebna je aktivacija koagulacijske kaskade koja dodatno započinje u krvnoj plazmi pri ozljedi krvne žile. Koagulacijska kaskada predstavlja proces u kojem se kaskadom kemijskih reakcija neaktivne bjelančevine izlučene pri ozljedi krvne žile, pretvaraju u aktivne proteaze. Naposljetku nastaje kompleks aktiviranih tvari koji se naziva aktivator protrombina. Aktivator protrombina, u prisutnosti dovoljne količine kalcijevih iona, potpomaže pretvorbu protrombina u trombin. Protrombin je bjelančevina plazme za čije je stvaranje u jetri potreban vitamin K i on se neprestano troši za zgrušavanje krvi posvuda u organizmu. Trombin koji nastaje iz protrombina ima slaba proteolitička svojstva koja omogućuju nastanak netopljivih fibrinskih monomera, a kasnije i niti, iz topljive bjelančevine fibrinogena. U početku nastanka fibrinskih niti, molekule fibrinskog monomera su povezane slabim vodikovim vezama pa je ugrušak nestabilan. U učvršćivanju ugruška sudjeluje faktor stabilizacije fibrina koji se otpušta iz trombocita u ugrušku i omogućuje stvaranje kovalentnih veza između fibrinskih monomera i susjednih fibrinskih niti (Guyton i Hall, 2012).

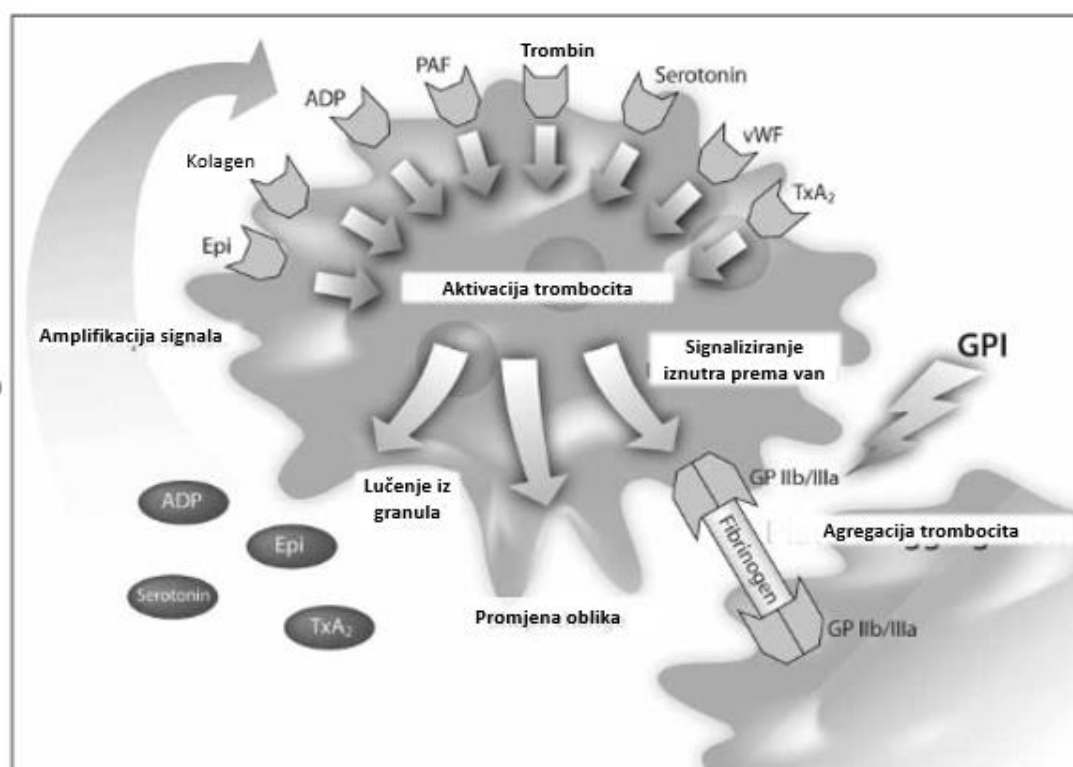
Nastali krvni ugrušak počinje se stezati i iz njega se istiskuje tekućina-serum. Za stezanje ugruška bitni su trombociti pričvršćeni za fibrinske niti koji ih dodatno međusobno povezuju, a osim toga kontraktilne bjelančevine poput aktina i miozina u trombocitima uzrokuju kontrakciju trombocitnih izdanaka i zbijanje fibrinske mrežice čime se stežu rubovi prekinute krvne žile. U stvaranju ugruška prisutna je pozitivna povratna sprega u kojoj ključnu ulogu ima trombin (Guyton i Hall, 2012).

Novija istraživanja pokazuju da nastali krvni ugrušak ima hijerarhijsku građu odnosno da gustoća pakiranja i aktivnost trombocita ovisi o gradijentu topljivih agonista koji su prisutni na mjestu ozljede (trombin, ADP, tromboksan A₂). Gustoća pakiranja i aktivnost trombocita najveće su u središtu ugruška zbog velikog oslobađanja trombina na mjestu ozljede dok prema površini ugrušak postaje rahlije pakiran i sadrži manje aktiviranih trombocita. Na površini veću ulogu imaju ADP i tromboksan A₂ koji se oslobađaju iz samih trombocita (Stalker i sur., 2013).

1.1.2. Induktori agregacije trombocita

Aktivacija trombocita (slika 2.) može biti potaknuta različitim topljivim ligandima, neovisno o vrsti induktora, aktivacija vodi do stvaranja GP IIb/IIIa kompleksa. Nastanak kompleksa posljedica je stvaranja nekovalentnih veza između GP IIb i IIIa podjedinica pri čemu nastaje heterodimerni integrinski receptor GP IIb/IIIa koji ima glavnu ulogu u agregaciji

trombocita. Većina integrinskih kompleksa nalazi se na površini trombocita dok je dio uskladišten u α -granulama odakle se oslobađa pri aktivaciji trombocita. Afinitet integrinskog receptora GP IIb/IIIa za svoje ligande nizak je u stanju mirovanja, a raste pri aktivaciji trombocita. Induktori agregacije trombocita su ADP, kolagen, von Willebrandov faktor, tromboksan A₂, trombin, adrenalin i drugi. Oni vežu za svoje receptore koji su izloženi na površini trombocita, a kroz slijed biokemijskih reakcija naposljetku potiču konformacijsku promjenu GP IIb/IIIa receptora koji tada može vezati fibrinogen i na taj način povezati susjedne trombocite što doprinosi nastanku stabilnog trombocitnog čepa (Kristensen i sur., 2012).



Slika 2. Aktivacija trombocita, a posljedično i agregacija, potaknuta je interakcijom pojedinih agonista s receptorima na površini trombocita (preuzeto i prilagođeno prema Kristensen i sur., 2012).

Svi agonisti agregacije, uključujući i one jake poput kolagena i trombina, između ostalog dovode i do otpuštanja ADP-a iz granula neovisno o signalnom putu koji su pokrenuli (Gachet, 2008). ADP kao slabi agonist veže za P2Y₁₂ i P2Y₁ receptore spregnute s G-proteinom. Uslijed vezanja ADP-a za P2Y₁₂ receptora dolazi do konformacijske promjene i odvajanja α -podjedinice G_i-proteina koja veže za adenilat ciklazu i inhibira sintezu cAMP-a. cAMP djeluje na cAMP ovisnu protein kinazu koja fosforilira određene proteine, uključujući i VASP protein,

a koji su nužni za održavanje trombocita u stanju mirovanja. Odvajanje $\beta\gamma$ podjedinice G_i -proteina aktivira fosfoinozitol-3-kinazu (PI3K) uz nastanak fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata koji omogućuje aktivaciju protein kinaze Akt. Kao konačan rezultat stimulacije PI3K signalnog puta, dolazi do aktivacije trombocita odnosno lučenja tvari iz granula i nastanka stabilnog trombocitnog čepa. Vezanje ADP-a za $P2Y_1$ receptore spregnute s G_q -proteinom dovodi do aktivacije fosfolipaze C (PLC) što uzrokuje nastanak sekundarnih glasnika diacilglicerola (DAG) i inozitol-1,4,5-trifosfata (IP3). DAG i IP3 aktiviraju protein kinazu C (PKC) i uzrokuju povećanje koncentracije kalcija u citosolu i sintezu tromboksana A₂. Tromboksan A₂ aktivira trombocite u blizini i potiče vazokonstrikciju djelovanjem na glatke mišiće krvnih žila (Stalker i sur, 2013).

Adrenalin (epinefrin). Trombociti na površini sadrže i adrenergičke α_2 -receptore za adrenalin. Adrenalin je simpatomimetski kateholamin koji se otpušta iz nadbubrežne žlijezde u stanjima stresa, a u velikim dozama pokazuje afinitet za α -receptore. Adrenalin se u nekoliko *in vitro* istraživanja pokazao kao slabi induktor, a u kombinaciji s drugim induktorima primjerice ADP-om i kolagenom djeluje sinergistički. Vezanje adrenalina za receptore spregnute s G_z -proteinom dijeli neke strukturne i funkcionalne karakteristike s G_i -proteinom vezanim uz $P2Y_{12}$ receptor. Istraživanja su pokazala inhibicijsko djelovanje na sintezu cAMP-a, a posljedično i na VASP protein pri čemu adrenalin uzorkuje njegovu defosforilaciju i na taj način omogućuje aktivaciju trombocita. Također je dokazano značajno aktivirajuće djelovanje adrenalina preko PI3K signalnog puta i Akt protein kinaze. Aktivacija adrenergičkih receptora na trombocitima povezana je i s porastom koncentracije slobodnog kalcija u citosolu što ima važnu ulogu u signalnim putevima povezanim s aktivacijom trombocita (Saaed i sur., 2004; Martin i sur., 2019). Zapaženo je i djelovanje povećane koncentracije kloridnih iona u trombocitima na pojačanu agregaciju trombocita posredovanu α_2 -adrenergičkim receptorima dok je s druge strane adrenalin potaknuo izmjenu bikarbonatnih i kloridnih iona stimulacijom enzima ugljične anhidraze. Postojeći diuretici koji potpomažu izlučivanje klorida iz organizma mogli bi smanjiti utjecaj adrenalina na agregaciju (Spalding i sur., 1998).

1.2. Kardiovaskularne bolesti

Hemostaza je normalan fiziološki proces koji se cijelo vrijeme odvija u našem organizmu, no u nekim slučajevima dolazi do određenih poremećaja hemostaze koji tada dovode do razvoja kardiovaskularnih bolesti. Kardiovaskularne bolesti obuhvaćaju poremećaje srca i krvnih žila među kojima su koronarna bolest srca, cerebrovaskularna bolest, bolest perifernih arterija, reumatska bolest srca, kongenitalna bolest srca, duboka venska tromboza i plućna embolija (<https://www.who.int/>).

Čimbenici rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti na koje možemo utjecati su hipertenzija, hiperlipidemija, pušenje, pretilost, tjelesna neaktivnost, nepravilna prehrana i konzumacija alkoholnih pića dok su oni na koje se ne može utjecati dob, spol i obiteljska anamneza. Europsko kardiološko društvo preporučuje SCORE tablice kao metodu procjene ukupnog kardiovaskularnog rizika s obzirom na specifične vrijednosti čimbenika kardiovaskularnog rizika (Piepoli, 2016).

Najčešći patofiziološki uzrok kardiovaskularnih bolesti jest ateroskleroza koja obuhvaća promjene, oštećenja i naslage na stijenkama krvnih žila, najčešće arterija. Lokalna zadebljanja nazivaju se plakovi ili ateromi, a sastoje se od jezgre koja je izgrađena od lipida, raspadnutih stanica i upalnih stanica te od takozvane kape sastavljene od promijenjenih glatkih mišićnih stanica i vezivnog tkiva. Smatra se da do nastanka ateroskleroze dolazi kod izmijenjenog endotela krvne žile usred povišenih lipida u krvi, povišenog tlaka, pušenja, imunoloških reakcija pa čak i usred izlaganja nekim bakterijama i virusima. Na izmijenjeni endotel počinju prianjati bijele krvne stanice koje odlaze u intimu krvne žile gdje diferenciraju u makrofage koji fagocitiraju LDL i prelaze u pjenaste stanice. Usred ponavljanih oštećenja odnosno konstantno prisutnog rizičnog čimbenika, primjerice povišenih lipida u krvi, pjenaste stanice postepeno propadaju, a istovremeno se počinje stvarati nakupina stanica glatkih mišića i vezivnog tkiva u obliku kape oko nakupine lipida. Najteža posljedica vezana uz aterosklerozu nastaje pri pucanju vezivne kape pojedinog ateroma. Iako veće nakupine dovode do smanjenog protoka krvi, veći problem stvaraju manje i nestabilne nakupine koje češće pucaju. Uslijed puknuća dolazi do ulaska krvi iz krvne žile u nakupinu pri čemu može doći do djelomičnog ili potpunog začepljenja krvne žile uslijed nastanka ugruška (Reiner, 2012).

Trombociti imaju značajnu ulogu u kardiovaskularnim bolestima te čine poveznicu između početne upalne reakcije, ateroskleroze i aterotromboze. Aktivirani trombociti luče razne citokine iz α -granula među kojima su i proupalni medijatori koji potiču pristizanje leukocita na

mjesto aterosklerotskog plaka, a osim toga dolazi do izlaganja površinskih adhezijskih molekula za leukocite i pojačanja upalnog odgovora na mjestu promijenjenog endotela krvne žile uslijed izloženosti rizičnim čimbenicima). U slučaju kidanja kape aterosklerotske nakupine, dolazi do brze aktivacije i agregacije trombocita, aktivacije koagulacijske kaskade i stvaranja tromba na istom mjestu. Tromb je abnormalni ugrušak koji nastaje, a ukoliko se odvoji od hvatišta zbog protoka krvi naziva se embolus. Embolusi iz velikih arterija ili lijeve strane srca mogu biti prenijeti krvlju na periferiju i začeptiti arterije u mozgu, bubrezima i drugdje. Ukoliko dolaze iz vena ili desne strane srca mogu uzrokovati plućnu emboliju. Trombociti u pojedinaca koji imaju neki od rizičnih faktora za nastanak kardiovaskularnih bolesti pokazali su svojstvo pojačane aktivacije i agregacije *in vitro* (Lievens i Hundelshausen, 2011; Guyton i Hall, 2012).

1.3. Antiagregacijska terapija

Antiagregacijska terapija potrebna je u prevenciji aterotrombotičkih događaja zbog značajne uloge trombocita u kardiovaskularnim bolestima. Postojeći antiagregacijski lijekovi na tržištu djeluju na različite mete uključene u proces prijanjanja i nagomilavanja trombocita, a dijele se na inhibitore ciklooksigenaze, antagoniste ADP receptora, antagoniste GP IIb/IIIa receptora, antagoniste PAR-1 receptora, analoge prostaglandina i inhibitore fosfodiesteraze. Često se propisuju kombinacije lijekova koji djeluju na različite mete pri čemu je njihovo djelovanje aditivno ili sinergističko. Uz antiagregacijsku terapiju često se vežu pojave rezistencije i nuspojava zbog čega se sve više istražuju sigurnije terapijske opcije (McFadyen i sur., 2018).

Acetilsalicilna kiselina (ASK) spada u skupinu lijekova s analgetskim, antipiretskim i protuupalnim učincima, a uz to je i jedan od najčešće korištenih lijekova u terapiji kardiovaskularnih bolesti. ASK, u nižim dozama, u trombocitima ireverzibilno inhibira enzim ciklooksigenazu-1 (COX-1) acetilacijom serinskog ostatka u blizini aktivnog mjesta enzima i na taj način sprječava vezanje endogenog supstrata arahidonske kiseline i sintezu tromboksana A₂ bitnog za indukciju aktivacije i agregacije trombocita. S obzirom da u trombocitima nema sinteze novih proteina, djelovanje acetilsalicilne kiseline traje onoliko koliko i životni vijek trombocita (9-12 dana). Opravdana je uporaba u sekundarnoj prevenciji odnosno nakon već preboljelog kardiovaskularnog incidenta ili postojeće kardiovaskularne bolesti. Istraživanja su pokazala da se najbolji antitrombotični učinak postiže s dozama 50-325 mg dnevno, a najčešće se primjenjuje dnevna doza od 75 mg. Novija istraživanja (ARRIVE, ASCEND, ASPREE) pokazala su da acetilsalicilna kiselina ne pokazuje značajan učinak u primarnoj prevenciji kod osoba koje imaju određene čimbenike rizika te da dugoročno dvostruko povećavaju rizik od ekstrakranijalnog krvarenja, najviše u gornjem gastrointestinalnom traktu (Katzung, 2017; Patrono i Baigent, 2019).

Tromboksan A₂ ima ograničenu ulogu u agregaciji te monoterapija acetilsalicilnom kiselinom nije dovoljna u nekim stanjima visokog rizika kao što su akutni koronarni sindrom ili perkutana koronarna intervencija. Inhibitori ADP-om ovisne agregacije trombocita imaju značajan antiagregacijski učinak ponajviše u početnoj fazi aktivacije trombocita. Mehanizam njihova djelovanja je inhibicija P2Y₁₂ receptora za ADP na membranama trombocita. Prvi lijek iz ove skupine peroralnih antiagregacijskih lijekova u kliničkoj primjeni jest tiklopidin koji se pokazao učinkovitim u terapiji ishemijskog moždanog udara, angine pektoris te pri ugradnji

koronarnih stentova, ali zbog odgođenog početka djelovanja i čestih nuspojava (trombotična purpura i aplastična anemija), koje uvjetuju čestu kontrolu krvne slike, istisnut je iz uporabe pronalaskom klopidozrela. Ipak, koristi se u slučajevima rezistencije na klopidozrel. Klopidozrel ima brži farmakodinamski učinak uz manje hematoloških nuspojava te se pokazao učinkovitijim u sekundarnoj prevenciji ishemijskog moždanog udara od ASK, a kombinirano liječenje acetilsalicilnom kiselinom i klopidozrelom postalo je standardna terapija nakon ugradnje stenta. Klopidozrel se aktivira pomoću CYP2C19 enzima u dvije faze što ga čini podložnim interakcijama s drugim lijekovima i pojavi genskih polimorfizama pri čemu su pojedinci koji su spori metabolizatori u nemogućnosti metabolizirati, a time i aktivirati sam lijek zbog čega dolazi do rezistencije odnosno neuspješnog liječenja. Zbog navedenih nedostataka uslijedio je razvoj prasugrela. Prasugrel ima brži i učinkovitiji metabolizam te nema zabilježene značajne pojave genske varijabilnosti. Uporabom prasugrela postignuto je uspješnije smanjenje ishemijskih događaja u usporedbi s klopidozrelom, ali zbog većeg rizika od krvarenja ne preporučuje se starijima od 75 godina. Najnoviji inhibitor P2Y₁₂ receptora jest tikagrelor i njegova prednost jest reverzibilno vezanje za P2Y₁₂ za razliku od prethodno navedenih ireverzibilnih inhibitora. Dokazano je statistički značajno smanjenje ishemijskih događaja, rizika od krvarenja i mortaliteta u usporedbi s prethodnim inhibitorima. Kangrelor je reverzibilni inhibitor P2Y₁₂ receptora i jedini se primjenjuje intravenski nakon čega postiže djelovanje za nekoliko minuta. Kangrelor se koristi kod perkutane koronarne intervencije u slučajevima kada pacijent ne prima peroralno inhibitor P2Y₁₂ ili GP IIb/IIIa antagonist (Knežević, 2014; Katzung, 2017).

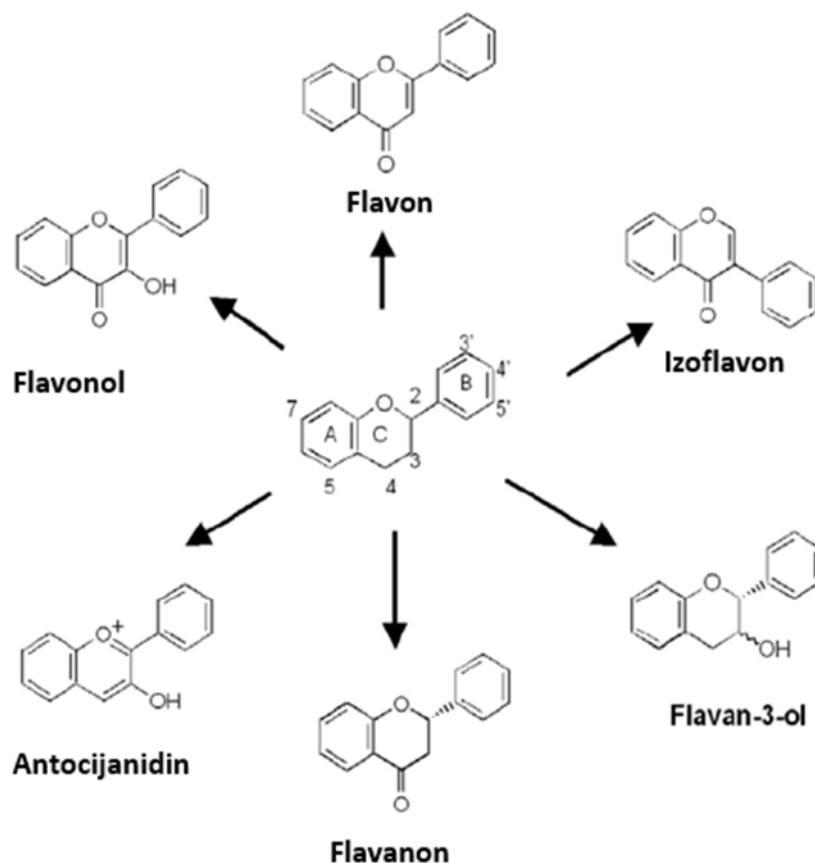
Dostupni lijekovi iz skupine antagonista GP IIb/IIIa integrinskog receptora su abciaksimab, tirofiban i eptifibatib. Iako im se strukturna i farmakokinetička svojstva razlikuju, djelovanje im je zajedničko: onemogućuju međusobno prijanjanje, a time i agregaciju trombocita. Primjena lijekova iz ove skupine je intravenska te se najčešće koriste za prevenciju infarkta miokarda uslijed akutnog koronarnog sindroma (King i sur., 2016). Vorapaksar je antagonist PAR-1 receptora za trombin koji se koristi za smanjenje aterotrombotskih događaja u bolesnika s infarktom miokarda ili perifernom arterijskom bolešću. Ne koristi se kod pacijenata s preboljelim moždanim udarom ili intrakranijalnim krvarenjem zbog povećanog rizika od krvarenja (Lam i Tran, 2015). Inhibitor fosfodiesteraze cilostazol reverzibilno blokira agregaciju trombocita i uzrokuje širenje krvnih žila čime poboljšava protok krvi, a najčešće se koristi kod cerebrovaskularne bolesti, koronarne bolesti srca uslijed perkutane koronarne intervencije te periferne arterijske bolesti kod koje je prisutna intermitentna klaudikacija te je

dokazana učinkovitost u vidu lakšeg kretanja bolesnika. Prednost cilostazola jest mali rizik od krvarenja dok je nedostatak slaba adherencija pacijenata uslijed nuspojava kao što su glavobolja, omaglica i drugi (Rogers i sur., 2015).

Još jedan antiagregacijski lijek u primjeni jest dipiridamol. Dipiridamol uz vazodilatatorno djelovanje ima i antiagregacijsko djelovanje zbog inhibicijskog djelovanja na prijenos adenzina u trombocite i na enzim fosfodiesterazu. Indiciran je kod sekundarne prevencije cerebrovaskularne bolesti u kombinaciji s aspirinom te za prevenciju tromboembolije pri ugradnji umjetnih srčanih zalistaka (Katzung, 2017).

1.4. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi biljnog porijekla. Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji imaju važnu ulogu u zaštiti biljaka od štetnog učinka ultraljubičastog zračenja i nametnika, a nalaze se u listovima, cvjetovima, plodovima i kori. Prisutni su u velikom broju biljnih vrsta, a poznato je više tisuća različitih polifenolnih spojeva. Građeni su od najmanje jednog aromatskog prstena na koji su vezane jedna ili više hidroksilnih skupina. Prema strukturnim karakteristikama odnosno broju fenolnih prstenova i poveznicama između prstenova dijele se na fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane (slika 3.). Glavni izvor polifenola u prehrani čine voće i napitci, a u manjem broju i povrće i žitarice (Manach i sur., 2004).



Slika 3. Osnovna strukturna formula ($C_6-C_3-C_6$) i klase flavonoida (preuzeto iz Nishiumi i sur, 2011).

Pojam flavonoida označava skupinu biljnih spojeva koji su prema strukturi derivati benzopirona, a u prirodi se pojavljuju u obliku aglikona, glikozida ili metiliranih derivata što uvelike doprinosi njihovoj različitosti. Osnovna struktura flavonoida sastoji se od benzenskog prstena povezanog sa šesteročlanim prstenom koji kao supstituent na poziciji 2 nosi fenilnu skupinu. Šesteročlani prsten može biti γ -piron (flavonoli i flavononi) ili njegov dihidroderivat (flavanoli i flavanoni). Ukoliko se fenilna skupina nalazi na poziciji 3 u šesteročlanom prstenu tada se radi o izoflavonoidima. Osim navedenih u prirodi su zastupljeni i antocijanidini te katehini (flavan-3-oli) (Havsteen, 1983).

Za proučavanje bioloških učinaka flavonoida potrebno je poznavati njihovu farmakokinetiku odnosno apsorpciju, distribuciju i metabolizam. Većina flavonoida nalazi se u glikoziliranom obliku u prirodi te prije apsorpcije dolazi do hidrolize u aglikone djelomično već u tankom crijevu, a u većoj mjeri u debelom crijevu djelovanjem enzima bakterija. Farmakološki učinak pojedinog flavonoida uvelike je ovisan o broju i položaju hidroksilnih skupina koje u jetri i tankom crijevu podliježu konjugaciji u *O*-glukuronide, sulfat-estere i *O*-metiletere. Oksidacija nije toliko zastupljena u metabolizmu flavonoida, ali također može utjecati na biološka svojstva. Kod pojedinih spojeva dolazi i do enterohepatičke cirkulacije (Čović i sur., 2009).

Pojedine klase flavonoida zastupljene su u različitim namirnicama. Najzastupljeniji flavanoni su naringenin i hesperitin, u prirodi se pojavljuju kao hidroksilirani, glikozilirani ili *O*-metilirani derivati flavanona. Najznačajniji izvor flavanona je citrusno voće poput gorke naranče i grejpa. Među flavonole spadaju kempferol i kvercetin, a najznačajniji izvori su žuti i crveni luk, rajčice, trešnje i jabuke. Flavoni poput luteolina i apigenina su pronađeni u celeru, peršinu i pojedinom začinskom bilju. Flavan-3-oli se u prirodi pojavljuju u raznim oblicima, od monomera poput katehina i epikatehina do polimernih proantocijadina poznatijih kao tanina. Neki od izvora flavan-3-ola su zeleni čaj (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) i kakaovac (*Theobroma cacao* L.). U izoflavone spadaju daidzein i genistein koji su prisutni u mahunarkama, a najpoznatija prehrambena namirnica koja ih sadrži izvor jest soja. Izoflavoni strukturno nalikuju estrogenu te su klasificirani kao fitoestrogeni. Antocijanidini su u prirodi prisutni u obliku konjugata s organskim kiselinama i šećerima, a najčešći aglikoni su pelargonidin, cijanidin, delphinidin, peonidin i drugi. Antocijanidini daju boju cvjetovima i plodovima biljaka, a najviše su zastupljeni u bobičastom voću i crnom vinu (Del Rio i sur., 2013).

Istraživanje povoljnih učinaka polifenolnih spojeva na zdravlje u velikoj se mjeri istražuje u novije vrijeme, a pripisana su im različita djelovanja poput protuupalnog, antikancerogenog, hepatoprotektivnog, antibakterijskog i antivirusnog. Za navedene učinke zaslužna je antioksidativna i antiradikalna aktivnost flavonoida koja se intenzivno istražuje, a kao glavna odrednica antioksidativnog djelovanja ističe se struktura flavonoida odnosno broj i smještaj hidroksilnih grupa na prstenu B. Mehanizmi antioksidacijskog djelovanja flavonoida obuhvaća hvatanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), keliranje metala i inhibiciju enzima uključenih u stvaranje istih, obnovu enzima koji sudjeluju u antioksidativnoj aktivnosti. Flavonoidi također umanjuju oštećenje uslijed lipidne peroksidacije koje je posljedica oksidativnog stresa uslijed stvaranja ROS (Kumar i Pandey, 2013).

Gledano na razini organa i organskih sustava prepoznato je blagotvorno djelovanje flavonoida na razne bolesti. Istraživanja su pokazala učinak flavonoida u prevenciji dijabetesa preko više mehanizama: regulacija metabolizma glukoze, aktivnosti jetrenih enzima te lipidnog profila (Al-Ishaq, 2019). Dokazano je i hepatoprotektivno djelovanje pojedinih flavonoida iz citrusa (Akachi i sur., 2010). Antikancerogeno djelovanje nije u potpunosti razjašnjeno, ali postoji korelacija između prehrane bogate flavonoidima i nižeg rizika od raka kolona, prostate i dojke (Batra i Sharma, 2013). U posljednje vrijeme istražuje se i utjecaj na neurodegenerativne bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti pri čemu je problem prijelaz flavonoida kroz krvno-moždanu barijeru i pronalazak odgovarajućeg terapijskog oblika (Andrade i sur., 2016).

Jedno od najviše istraživanih učinaka flavonoida jest njihov učinak na prevenciju i terapiju kardiovaskularnih bolesti koji u podlozi sadrži i antiagregacijski učinak flavonoida. Biokemijski mehanizmi antiagregacijskog učinka flavonoida nisu u potpunosti razjašnjeni. Postoji velik broj istraživanja *in vitro* i *in vivo* koji su dokazali antiagregacijski učinak pojedinih flavonoida ili pojedinih namirnica čije se antiagregacijsko djelovanje pripisuje flavonoidima, a djelovanje se povezuje s različitim mehanizmima djelovanja na signalne puteve poput inhibicije ciklooksigenaze i lipooksigenaze, a koje sudjeluju u metabolizmu arahidonske kiseline u trombocitima, inhibicija fosfodiesteraza smanjujući cAMP u trombocitima i inhibirajući tirozin kinaze koje su povezane s aktivacijom trombocita posredovanom kolagenom (Guarrero i sur., 2005).

Važna karakteristika flavonoida je njihova lipofilnost. Većina flavonoida je slabo topljiva u vodi te stoga postoji tendencija za smještanjem u lipidni dvosloj bioloških membrana što je važan čimbenik njihove biološke aktivnosti (van Dijk i sur., 2000.).

1.4.1. Francuski i azijski paradoks

Povećanje interesa za istraživanjem pozitivnih bioloških učinaka flavonoida potaklo je i otkriće takozvanog francuskog paradoksa koji povezuje nisku stopu mortaliteta od kardiovaskularnih bolesti kod populacije na području Mediterana s konzumacijom crnog vina i hrane bogate zasićenim mastima (Nijveldt i sur., 2001). Termin je nastao 1992. godine uz pretpostavku da glavnu ulogu u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti ima alkohol odnosno crno vino. Dodatna istraživanja pokazala su da je aktivnost trombocita manja u Francuskoj nego u nekim drugim europskim zemljama (Renaud i Langeril, 1992). Kasnije je pokazano da je navedena pojava vezana isključivo za crno vino koje je bogato polifenolima među kojima su flavonoli (miricetin, kempferol, kvercetin) zatim flavan-3-oli (katehini, proantocijanidini) te antocijanidini, fenolne kiseline i stilben resveratrol, a ne za sva alkoholna pića koja u pravilu u povećanom unosu djeluju štetno na organizam (Catalgol i sur., 2012).

Azija je karakteristična po velikoj potrošnji cigareta, a unatoč dokazanom povećanom riziku od kardiovaskularnih bolesti kod pušača, u Aziji je rizik od obolijevanja od kardiovaskularnih bolesti nizak. Niska incidencija kardiovaskularnih bolesti rezultat je značajne konzumacije zelenog čaja kod azijskog stanovništva koja u prosjeku iznosi 1,2 L. Zeleni se čaj izrađuje od osušenih listova biljke *C. sinensis* koja u kemijskom sastavu ima preko 4000 spojeva od kojih 1/3 čine polifenoli. Najveći udio čine katehini, flavonoli i fenolne kiseline (Sumpio i sur., 2006).

2. Obrazloženje teme

U današnje vrijeme sve se više upozorava na učestalost pojave kardiovaskularnih bolesti. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije za 2019. godinu upravo su kardiovaskularne bolesti najčešći uzrok smrti u svijetu što statistički gledano iznosi 31% od ukupnih smrtnih slučajeva godišnje odnosno oko 17 milijuna smrti (www.who.int).

Za samu prevenciju kardiovaskularnih bolesti potrebno je osvijestiti i informirati ljude o zdravim životnim navikama i faktorima rizika, a u slučaju razvoja bolesti potrebna je brza intervencija u vidu savjetovanja i farmakoterapije. Istraživanja pokazuju da određeni čimbenici poput postojeće hipertenzije, hiperkolesterolemije i dijabetesa uvelike doprinose samom razvoju bolesti isto kao i debljina, fizička neaktivnost te ostale nezdrave životne navike. Osim navedenog na razvoj bolesti utječe i oksidativni stres te pojačana koagulacija krvi i povećana aktivnost trombocita.

Postojeća i najčešće propisivana antiagregacijska farmakoterapija je kombinacija acetilsalicilne kiseline i klopidoigrela koja sa sobom nosi određene nuspojave i rizike te se stoga sve više istražuju potencijalne terapijske mogućnosti iz prirode. S obzirom da su u brojnim istraživanjima polifenoli pokazali razne korisne učinke među kojima je i antiagregacijski učinak pokazan od strane flavonoida, poželjno je detaljnije ispitati takva svojstva. Primjeri iz stvarnog života koji su dokaz djelovanja polifenola su azijski i francuski paradoks u kojima se pretpostavlja povoljan učinak polifenola iz hrane unatoč na prvi pogled lošoj prehrani i životnim navikama.

Svrha je ovog rada ispitati *in vitro* učinak jednog od flavonoida – flavanona, na agregaciju trombocita u prisustvu adrenalina kao induktora agregacije te odrediti minimalnu antiagregacijsku koncentraciju ispitivanog flavonoida. Iz dobivenih rezultata bit će moguće doprinijeti razumijevanju mehanizma antiagregacijskog učinka flavonoida u prisutnosti adrenalina. Navedeno istraživanje provodi se uz metodu impedancijske agregometrije na uzorcima dobrovoljnih davatelja krvi koji nisu na antiagregacijskoj terapiji.

3. Materijali i metode

Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu odobrilo je korištenje po 4,5 mL venske krvi uzete u spremnik s natrijevim citratom kao antikoagulansom od 20 dobrovoljnih darivatelja krvi za potrebe izrade eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada na sastanku održanom 26. 11. 2019. godine. Za sudjelovanje u ovom istraživanju dobrovoljni davatelji dužni su potpisati informirani pismeni pristanak (u Prilogu).

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci i standardi

Uzorci krvi. U eksperimentu je korišteno 20 uzoraka pune krvi dobrovoljnih davatelja krvi na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu. Uzorci su uz pristanak davatelja uzeti prilikom uzimanja krvi za druge pretrage, a od svakog davatelja uzeto je 4,5 mL pune krvi. Krv je sakupljena u vakuum epruvete (Vacutainer BD, SAD) s natrijevim citratom koji kompleksira kalcij iz uzorka i na taj način djeluje kao antikoagulans. Za pristupnika je bilo važno da ne uzima nikakvu terapiju protiv agregacije trombocita kako bi se izbjegli dodatni utjecaji na samu agregaciju. Uzorci su korišteni u istraživanju otprilike 3 sata nakon prikupljanja uzorka krvi.

Standard flavonoida. Flavonoid koji je korišten u određivanju antiagregacijskog učinka je standard flavanona (2-fenil-2,3-dihidrokromen-4-on) molekulske mase 224,25 g/mol. (Sigma-Aldrich, Švicarska). Odvaga od 2,7 mg standarda flavanona otopljena je u DMSO te je napravljen koncentracijski niz od 17 otopina metodom dvostrukog razrjeđenja konačnih koncentracija od 488 μ M do 7,5 nM (Tablica 1.).

Tablica 1. Konačne koncentracije flavanona uzete u ispitivanje antiagregacijskog učinka flavanona u prisustvu adrenalina kao induktora agregacije.

	Konačna koncentracija flavanona/ μM
R1	488,00
R2	244,00
R3	122,00
R4	61,00
R5	30,50
R6	15,30
R7	7,65
R8	3,83
R9	1,92
R10	0,96
R11	0,48
R12	0,24
R13	0,12
R14	0,06
R15	0,03
R16	0,015
R17	0,0075

3.1.2. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće kemikalije i otopine:

- induktor agregacije: adrenalin ampule masene koncentracije 1 mg/ml, a konačne koncentracije u otopini 10 μM (Alkaloid, Sjeverna Makedonija)
- dimetilsulfoksid (DMSO, Sigma Aldrich, Švicarska)
- fiziološka otopina (0,9% NaCl, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska)
- fiziološka otopina s dodatkom kalcijeva klorida (0,003 M CaCl_2 u 0,9 % NaCl, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Hrvatska)

3.1.3. Instrumenti i laboratorijski pribor

Ispitivanje je provedeno na analizatoru funkcije trombocita u punoj krvi Multiplate[®] (Roche, Švicarska) na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu. Multiplate[®] uređaj (slika 4.) radi na principu impedancijske agregometrije, a sastoji se od pet mjernih kanala koji omogućuju istovremeno mjerenje pet različitih uzoraka. U svakom kanalu nalazi se kiveta s dva para bakrenih elektroda presvučenih srebrom koje omogućuju dva nezavisna mjerenja istog

uzorka uz dodatak magnetskog mješača. Kivete su povezane s računalom i posebnim računalnim programom koji putem elektroda provodi mjerenje i bilježi podatke. Računalni program ujedno daje upute i naredbe za korištenje automatske pipete što smanjuje mogućnost pogrešaka. Neke od prednosti uređaja su mala količina pune krvi koja je potrebna za analizu (0,3 mL po testu) i brza priprema uzorka, s obzirom da centrifuga nije potrebna, te mogućnost odabira različitih testova ovisno o induktorima agregacije i sl. Multiplate® analizator služi za dijagnozu i pronalazak rješenja kod pacijenata s poremećajem agregacije trombocita te za praćenje učinkovitosti terapije antiagregacijskim lijekovima.



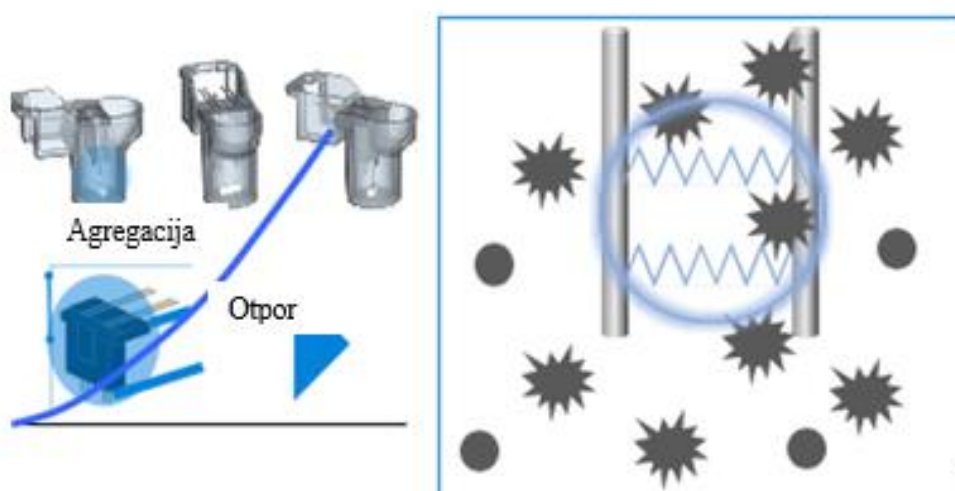
Slika 4. Multiplate® uređaj (preuzeto iz Harrison i Lordkipanidzé, 2013).

Za statističku analizu korišten je *t*-test u sklopu programa Microsoft Excel® (Microsoft, SAD).

3.2. Metode

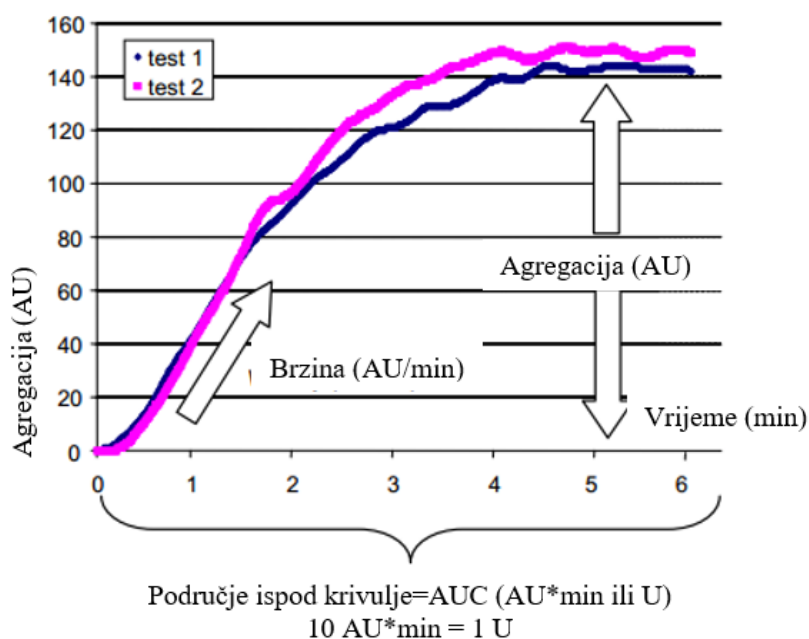
3.2.1. Ispitivanje agregacije trombocita

Praćenje agregacije trombocita provodi se metodom impedancijske agregometrije na Multiplate® uređaju. Impedancijska agregometrija podrazumijeva mjerenje električnog otpora između dvije elektrode pri čemu je porast otpora uzrokovan aktivacijom trombocita (slika 5.). Mjerenje se temelji na činjenici da trombociti aktivacijom izlažu svoje receptore na površini zbog čega poprimaju sposobnost agregacije i adherencije za ozlijeđene krvne žile, ali i umjetne površine, kao što su elektrode uređaja, što dovodi do povećanja otpora izmjeničnoj struji.



Slika 5. Slikoviti i grafički prikaz pojave agregacije i porasta otpora nakon aktivacije trombocita (preuzeto i prilagođeno iz www.haemoview.com.au/multiplate).

Uređaj bilježi porast otpora odnosno pojačanu agregaciju trombocita i izražava tu vrijednost u arbitarnim jedinicama agregacije (AU) u ovisnosti o vremenu u minutama (slika 6.). Uređaj istovremeno izrađuje grafički prikaz iz kojeg proizlazi najbitniji parametar prema kojem određujemo stupanj agregacije, a to je površina ispod krivulje (AUC) koja se koristi u daljnjoj podatkovnoj analizi. S obzirom da uređaj sadrži dva para elektroda, svaki grafički prikaz daje nam dva neovisna rezultata nakon čega program uzima srednju vrijednost i izražava je kao konačan rezultat (Calatzis i sur., 2007).



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti agregacije trombocita (arbitarna jedinica, AU) o vremenu (min) dobiven obradom uzorka na Multiplate® uređaju. Područje ispod krivulje (AUC, engl. *area under curve*) koristi se za daljnju analizu (preuzeto i prilagođeno prema Calatzis i sur., 2007).

3.2.2. Postupak provedbe testa agregacije trombocita

Provedba testa agregacije trombocita započinje postavljanjem kivete u inkubacijski blok uređaja Multiplate® i spajanjem elektroda na uređaj. Potrebno je upisati podatke o uzorku krvi, a nakon toga slijedi odabir programa s obzirom na induktor agregacije odnosno agonist koji se koristi. Za potrebe ovog istraživanja korišteni su programi ADP test i ASPI ASA test. Pojedini uzorci i reagensi dodaju se automatskom pipetom prema unaprijed postavljenom programu i uputama koje izdaje uređaj.

3.2.2.1. ADP test

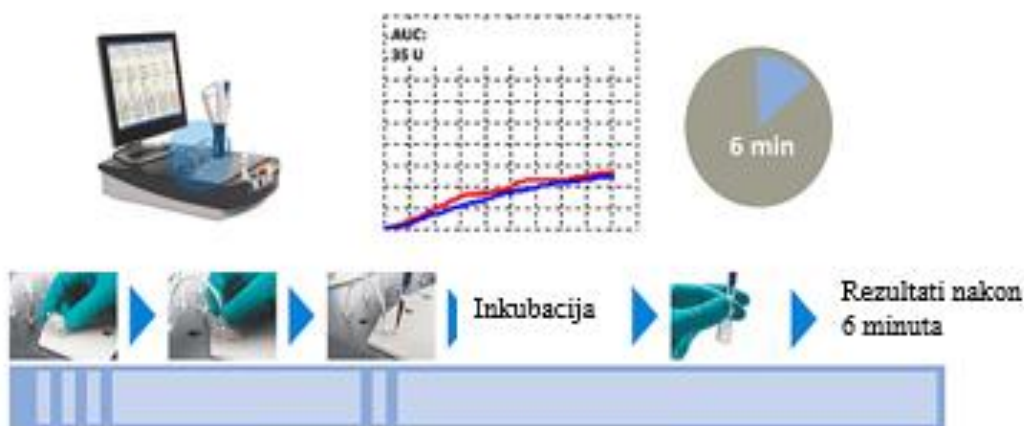
Uzorci pune krvi prvo su ispitani uz ADP test uz ADP kao induktor agregacije, a u svrhu probira na temelju AUC vrijednosti za daljnja ispitivanja. U kivetu se automatskom pipetom dodaje 300 μ L fiziološke otopine s dodatkom kalcijeva klorida termostahirane na 37 °C kako bi se omogućila normalna agregacija trombocita nakon što se pri uzimanju uzorka pune krvi u

epruvete dodao natrijev citrat u svrhu kompleksiranja i uklanjanja kalcija radi sprječavanja zgrušavanja uzorka. Slijedi dodatak 300 μL uzorka krvi prethodno ručno promućkane i inkubacija u trajanju 3 minute. Nakon inkubacije slijedi dodatak 20 μL ADP-a te inkubacija u trajanju od 6 minuta uz istovremeno crtanje grafa ovisnosti agregacije o vremenu i izračun AUC. Nakon navedenog ispitivanja slijedi ispitivanje agregacije trombocita u istim uzorcima krvi uz adrenalin kao induktor agregacije uz ADP test kako bi se vidjela učinkovitost adrenalina kao induktora u danim eksperimentalnim uvjetima. Postupak je isti kao i za ADP.

3.2.2.2. ASPI ASA test

ASPI ASA test korišten je u ispitivanju antiagregacijskog učinka flavonoida u prisustvu adrenalina na odabranim uzorcima pune krvi iz prethodnih ispitivanja (slika 7.). ASPI ASA test omogućuje dodatan korak u ispitivanju, a to je u ovom slučaju dodatak flavonoida. Prvo se dodaje 300 μL fiziološke otopine s CaCl_2 termostahirane na 37 °C, 20 μL kontrole (DMSO) ili razrijeđenog uzorka flavanona (5 μL flavanona otopljenog u DMSO i 15 μL fiziološke otopine) te 300 μL uzorka krvi. Sadržaj se ostavi inkubirati 3 minute na 37 °C. Zatim se dodaje 20 μL induktora agregacije adrenalina te se nastavi inkubirati i mjeriti tijekom 6 minuta uz istovremeno crtanje grafa ovisnosti agregacije o vremenu i izračun AUC.

Multiplate® Postupak testiranja

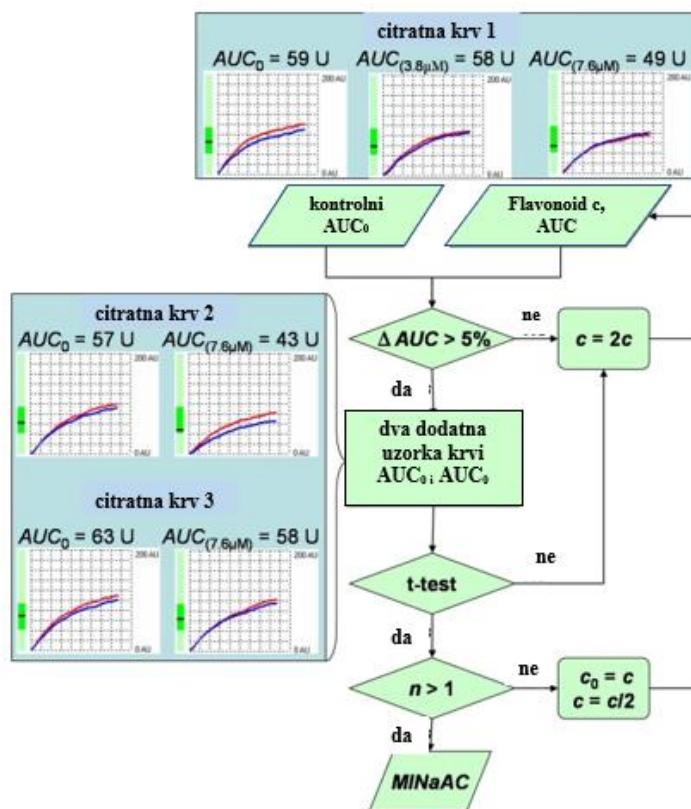


Slika 7. Postupak provedbe ispitivanja agregacije trombocita metodom impedancije agregometrije na Multiplate® uređaju (preuzeto i prilagođeno iz www.haemoview.com.au/multiplate).

3.2.3. Određivanje minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida (MINaAC)

Određivanje minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida počinje mjerenjem agregacije trombocita uz pomoć ASPI ASA testa u kontrolnom uzorku koji predstavlja uzorak pune krvi u kojem je umjesto ispitivanog flavonoida dodan DMSO (slika 8.). Iz tog mjerenja dobijemo vrijednost AUC_0 . Nakon kontrolnog uzorka ispituje se agregacija uzorka s flavonoidom (AUC) s najvećim razrjeđenjem. Ukoliko se te dvije izmjerene agregacije tj. vrijednosti površine ispod krivulja (AUC i AUC_0) razlikuju više od 5%, obavljaju se mjerenja na dva nova uzorka krvi različitih davatelja. Ukoliko nema statistički značajne razlike u mjerenjima između kontrole i uzorka flavonoida, koncentracija flavonoida se udvostruči i postupak ponovi. Ako rezultati sva tri mjerenja pokazuju statistički značajno smanjenje agregacije trombocita, u odnosu na kontrolni uzorak, a prema jednosmjernom Studentovom t -testu provedenom u programu Microsoft Excel, tada analizirana koncentracija predstavlja traženu minimalnu antiagregacijsku koncentraciju (MINaAC). Navedeno vrijedi, osim u slučaju da već prva koncentracija ($n=1$) pokazuje statistički značajno smanjenje agregacije. Ako

je to slučaj tada se ispitivanje ponavlja uz upola manju koncentraciju. Određivanje MINaAC je prikazano shematski na slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz određivanja minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida (MINaAC). Na grafu ovisnosti agregacije trombocita o vremenu plavom i crvenom linijom prikazana su paralelna mjerenja istog uzorka (preuzeto i prilagođeno prema Bojić i sur., 2011).

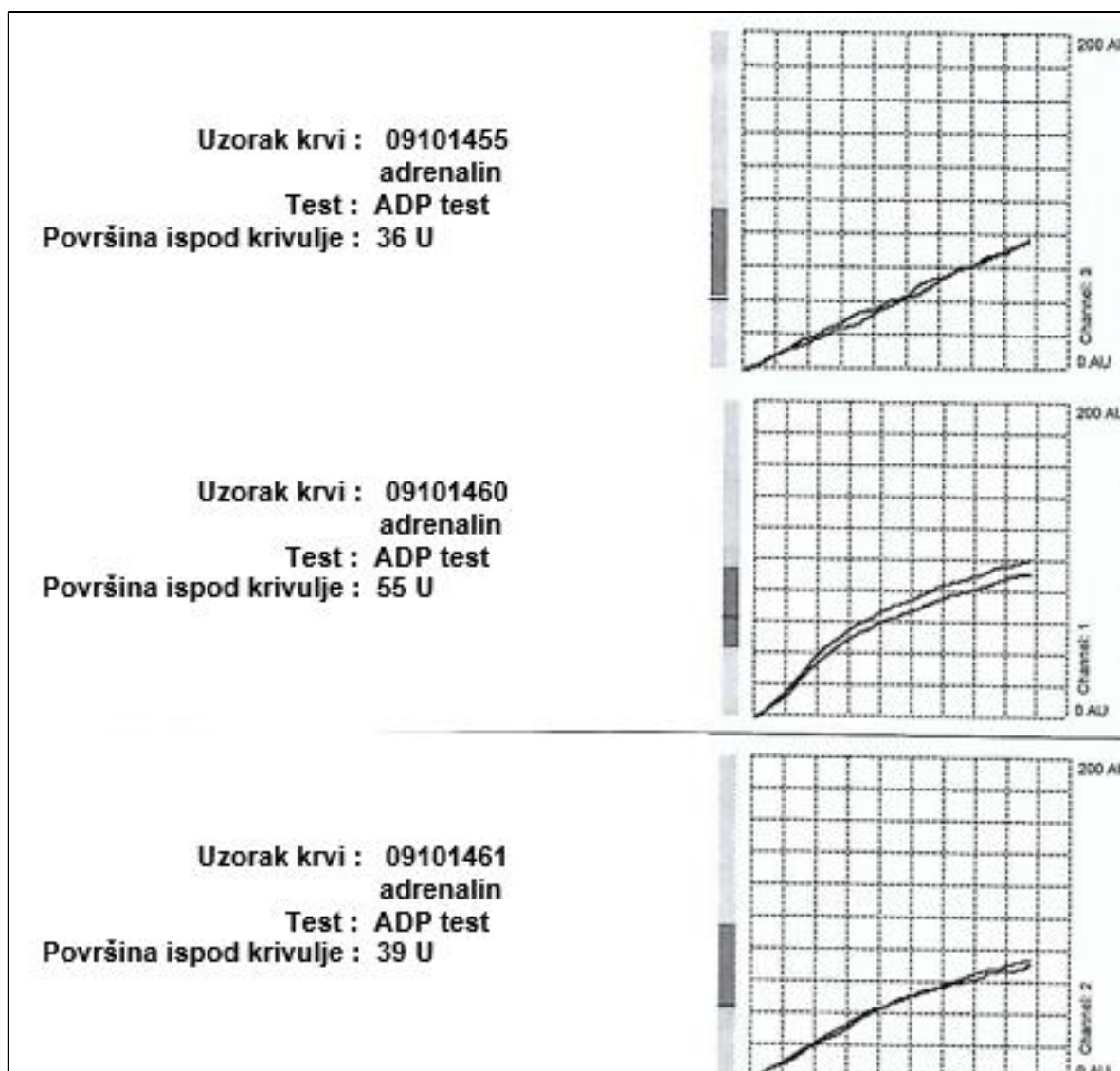
4. Rezultati

4.1. Rezultati impedancijske agregometrije

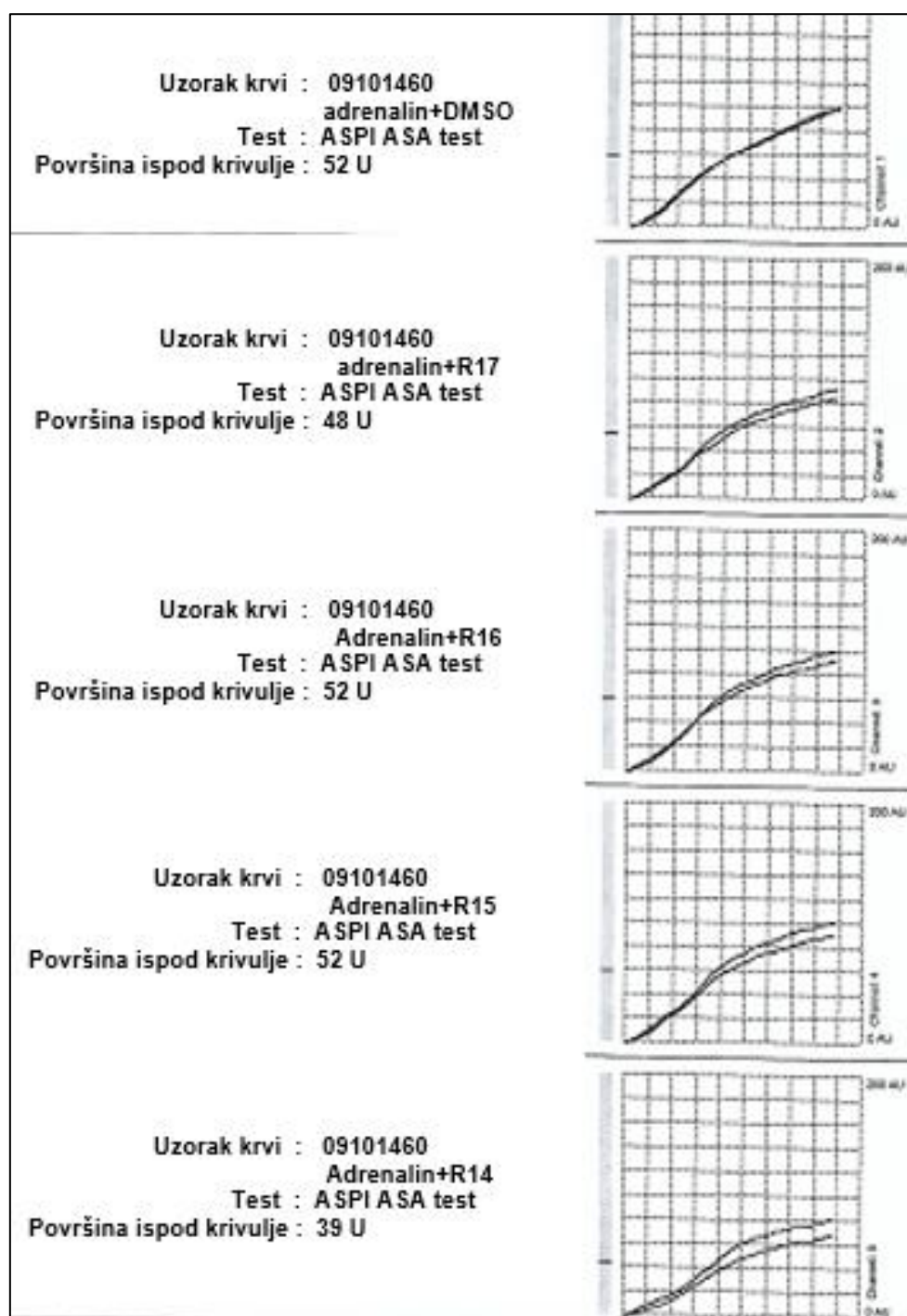
U nastavku su prikazani rezultati mjerenja antiagregacijskog učinka flavanona na agregaciju trombocita potaknutu adrenalinom dobiveni na Multiplate® uređaju metodom impedancijske agregometrije.

Na svim je slikama prikazan graf ovisnosti agregacije trombocita u arbitarnim jedinicama agregacije (AU) u ovisnosti o vremenu. Za svaku dobivenu krivulju izračunata je površina ispod krivulje (AUC) čije vrijednosti su navedene uz graf, a nadalje korištene u određivanju minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida.

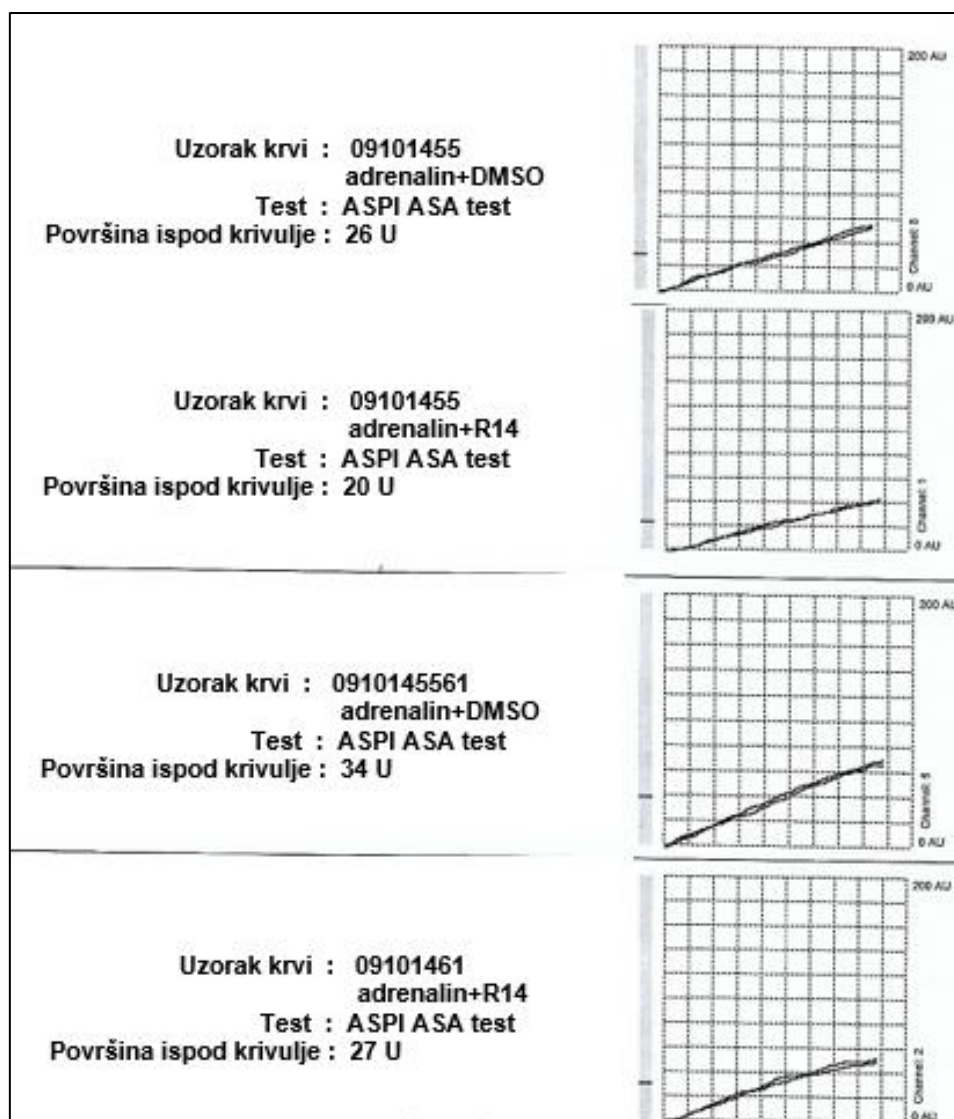
- Na slici 9. prikazani su rezultati mjerenja agregacije trombocita u tri različita odabrana nezavisna uzorka dobrovoljnih davatelja krvi uz adrenalin kao induktor agregacije.
- Na slici 10. prikazani su rezultati mjerenja agregacije trombocita u jednom od odabranih uzoraka uz DMSO kao slijepu probu i rezultati mjerenja agregacije trombocita uz dodatak različitih koncentracija flavanona dobivenih dvostrukim razrjeđivanjem uzorka flavanona uz adrenalin kao induktor agregacije.
- Na slici 11. prikazani su rezultati mjerenja agregacije trombocita u još dva dodatna uzorka uz DMSO kao slijepu probu i razrjeđenje flavanona R14 koje je u prethodno testiranom uzorku pokazalo statistički značajno smanjenje agregacije trombocita.



Slika 9. Rezultati mjerenja za tri odabrana uzorka dobrovoljnih darivatelja krvi uz adrenalin kao induktor agregacije.



Slika 10. Rezultati mjerenja za odabrani uzorak dobrovoljnih darivatelja krvi uz DMSO kao slijepu probu i različite koncentracije flavanona uz adrenalin kao induktor agregacije.



Slika 11. Rezultati mjerenja za dodatna dva uzorka dobrovoljnih darivatelja krvi uz DMSO kao slijepu probu i koncentraciju flavanona R14 (0,06 μ M) uz adrenalin kao induktor agregacije.

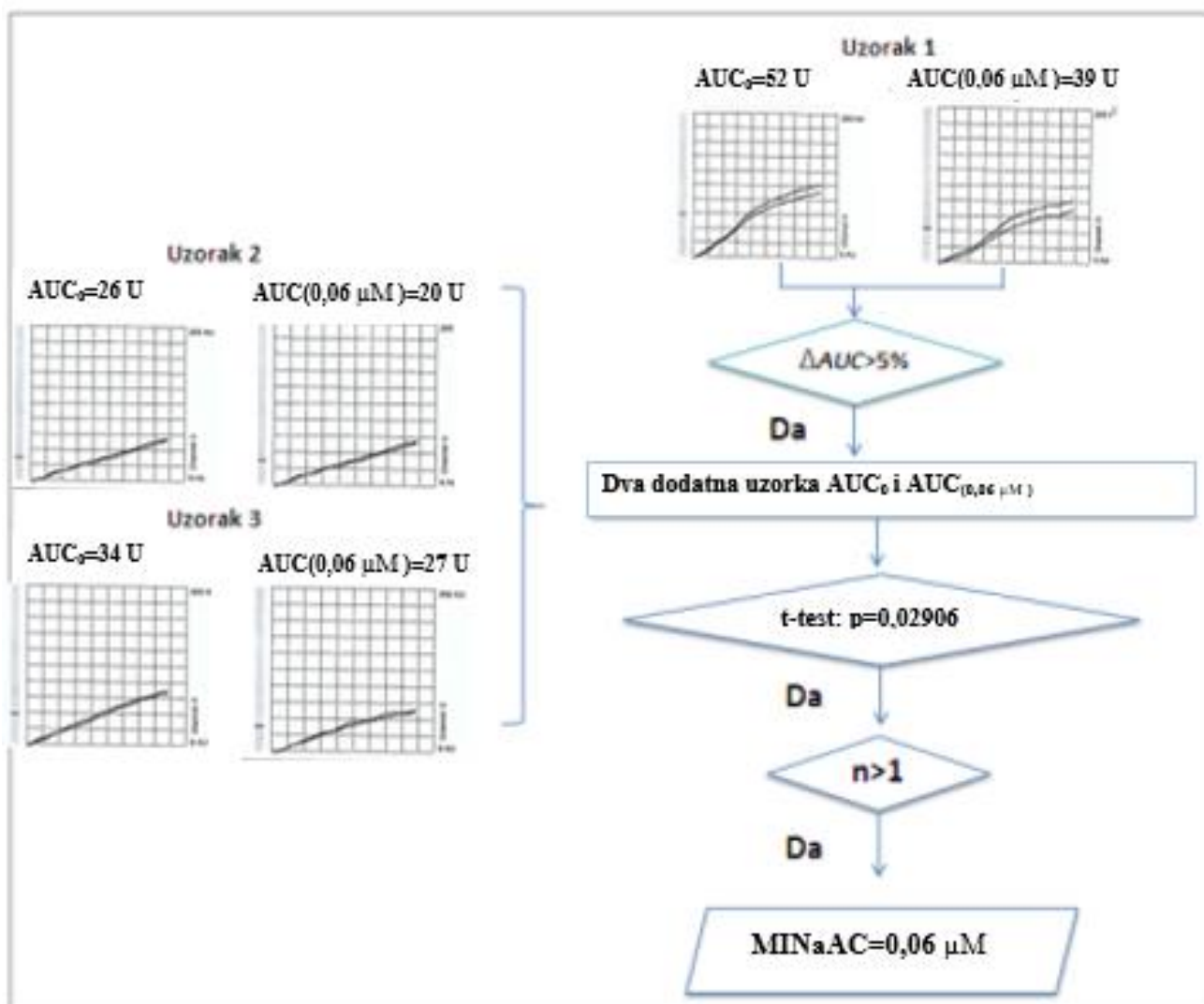
Statistički značajno smanjenje agregacije trombocita koje iznosi više od 5% i uzima se na daljnje razmatranje izmjereno je u uzorku krvi u koji je dodana koncentracija flavonoida R14 (0,06 μM). Radi se o izmjerenim vrijednostima AUC koji iznosi 52 U u uzorku s koncentracijom flavanona R15 (0,12 μM) i 39 U u uzorku s koncentracijom flavanona R14 (0,06 μM).

Statistički značajno smanjenje agregacije trombocita u uzorku (minimalna antiagregacijska koncentracija) odnosno razlika u postotku agregacije potvrđena je Studentovim *t*-testom (Tablica 2) uz razinu značajnosti 0,05. Minimalna antiagregacijska koncentracija flavanona uz prisustvo adrenalina u koncentraciji 10 μM kao induktora agregacije iznosi 0,06 μM (slika 12.).

Tablica 2. Studentov *t*-test kojim je potvrđena statistički značajno smanjenje agregacije trombocita u uzorku, a time i određena minimalna antiagregacijska koncentracija flavanona.

AUC ₀	AUC _{0,06 μM}
52	39
26	20
34	27
<i>P</i>	0,02906

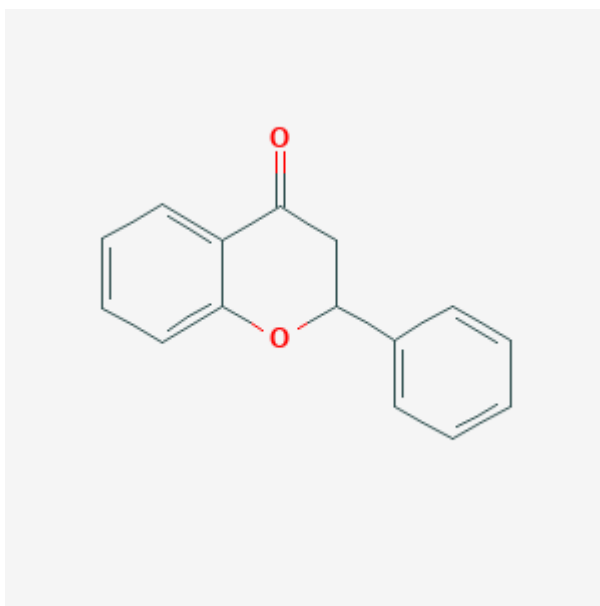
Rezultati AUC na uzorcima krvi u probiru najpovoljnijih uzoraka za istraživanje viši su od onih u kasnijem ispitivanju utjecaja flavanona na agregaciju zbog smanjenja aktivnosti trombocita s vremenom stajanja krvi u epruveti, ali i zbog mogućeg utjecaja DMSO otapala na smanjenje aktivnosti trombocita (Asmis i sur., 2010).



Slika 12. Postupak i dobivene vrijednosti MINaAC flavanona uz agonist adrenalin ($10 \mu\text{M}$) na tri nezavisna uzorka primjenom jednosmjernog t -testa za uparene uzorke uz razinu značajnosti 0,05.

5. Rasprava

U ovom radu ispitivan je antiagregacijski učinak flavanona (slika 13.) i određena njegova MINaAC u prisutnosti adrenalina kao induktora agregacije metodom impedancijske agregometrije na uzorcima pune krvi. Uzorci krvi uzeti su od dobrovoljnih darivatelja krvi uz pristanak i potvrdu o izostanku uzimanja antiagregacijske terapije kako bi se otklonio utjecaj na rezultate istraživanja. Korištenje pune krvi omogućuje slične uvjete biološkim uvjetima što također omogućuje veću točnost rezultata iako nije moguće u potpunosti simulirati uvjete agregacije u krvnoj žili zbog velikog broja čimbenika koji na nju utječu.



Slika 13. Struktura flavanona.

5.1. Mehanizam antiagregacijskog učinka flavanona

Standard flavanona u prisustvu adrenalina (10 μM) je u istraživanju pokazao antiagregacijski učinak. Određena je minimalna antiagregacijska koncentracija koja iznosi 0,06 μM . Dobiveni rezultat u kontekstu je rezultata iz istraživanja Babić i sur. (2019) prema kojem je određen MINaAC flavanona u prisustvu ADP-a (koncentracije 6.3 μM) kao slabog agonista i gdje određena MINaAC iznosi 0,063 μM . Postupak određivanja MINaAC flavanona u prisustvu ADP-a proveden je na jednak način kao i u ovom istraživanju metodom impedancijske agregometrije uz navedeni protokol. Osim uz ADP, u istom istraživanju određene su i MINaAC flavanona u prisustvu jakih agonista te one iznose za TRAP-6 (31 μM) 2,0 μM , a uz jake agoniste kolagen (3,1 $\mu\text{g/mL}$), ristocetin (0,3 mg/mL) i arahidonsku kiselinu (0,48 μM) MINaAC iznosi 0,5 μM . Prema tome je moguće potvrditi da je adrenalin slabi

induktor agregacije s obzirom da je za antiagregacijski učinak potrebna vrlo niska koncentracija flavanona.

S obzirom da je antiagregacijsko djelovanje flavanona dokazano i uz ostale induktore agregacije, moguće je zaključiti da bez obzira koji induktor koristili, flavanon statistički značajno smanjuje agregaciju trombocita. To ukazuje na nespecifično i neselektivno djelovanje flavanona na pojedine signalne puteve aktivacije i agregacije trombocita neovisno o induktoru agregacije. Uviđa se razlika u intenzitetu djelovanja pri čemu su MINaAC određene za slabe induktore poput ADP-a i adrenalina za jedan odnosno dva reda veličine manja od minimalnih antiagregacijskih koncentracija dobivenih u prisustvu jakih induktora poput kolagena odnosno TRAP-6.

Opisano je djelovanje flavonoida na pojedine signalne puteve pa su tako Pignatello i sur. (2015) pokazali da mediteranska prehrana koja uključuje velik unos flavonoida, poglavito u sastavu maslinovog ulja, smanjuje urinarnu ekskreciju 11-dehidro-tromboksana A2 koji je marker aktivnosti trombocitne COX-1 *in vivo* kod bolesnika s fibrilacijom atrijske. Tamna čokolada bogata polifenolima pokazala se učinkovitom u smanjenju adhezije trombocita u *in vitro* uvjetima u krvi osoba s postojećim endotelnim oštećenjima uzrokovanih pušenjem, u istraživanju Hermann i sur. (2006). Pretpostavlja se da je mehanizam posredovan antioksidacijskim učinkom flavonoida te mogućim utjecajem na aktivnost lipooksigenaze. Freedman i sur. (2001) pokazali su i *in vitro* i *ex vivo* utjecaj soka od crvenog grožđa na smanjenje agregacije trombocita, a izmjereni parametri su pokazali povećanu proizvodnju dušikovog oksida u trombocitima i smanjen nastanak superoksidnog aniona. Pretpostavka je da je navedeni učinak posljedica dvostrukog mehanizma-antioksidacijskog djelovanja i direktnog djelovanja flavonoida iz grožđa na protein kinazu C u trombocitima.

Osim utjecaja na signalne puteve, važan učinak flavonoida posljedica je vezanja za membranske receptore. Istraživanje koje su proveli Guarrero i sur. (2005) pokazalo je da se pojedini flavonoidi (apigenin, genistein, luteolin) vežu za membranske receptore za tromboksan A2 i djeluju antagonistički.

U istraživanju koje su proveli Bojić i sur. (2011), na cijelom nizu flavonoida iz različitih skupina, opisan je odnos strukture i aktivnosti (SAR) pojedinih flavonoida. Istraživanje je pokazalo da se antiagregacijski učinak smanjuje s postojanjem hidroksilnih skupina kao supstituenata na prstenima A i B, dok se porast antiagregacijskog učinka bilježi kod postojanja O-metilnih skupina. U slučaju da flavonoid sadrži više od četiri supstituenta, antiagregacijski učinak se smanjuje bez obzira na vrstu supstituenta. Najpotentnijim flavanononima pokazali su

se derivati flavanona *p*-*O*-metilirani na B prstenu. Ovakav rezultat može se objasniti činjenicom da veća lipofilnost i volumen metilnog radikala dovode do bolje interakcije s lipidnim dvoslojem membrana trombocita povećavajući njihovu rigidnost.

Istraživanje van Dijk i sur. (2000) pokazalo je da flavonoli imaju blago povišen afinitet prema umjetnim lipidnim membranama i interakciju s istima u usporedbi s flavanonima što se pripisuje planarnosti molekule flavonola. Unatoč tome, flavanon u prisutnosti ADP-a i adrenalina kao induktora agregacije pokazuje najmanju MINaAC od svih istraženih flavonoida u istraživanju Bojića i sur. (2011). U istraživanju Bojić i sur. (2012) MINaAC u vrijednosti od 0,06 μ M određen samo za 6-hidroksiflavin u prisutnosti induktora agregacije antibiotika ristocetina.

Istraživanje provedeno od strane Babić i sur. (2019) pokazalo je direktnu povezanost između lipofilnosti pojedine skupine flavonoida izmjerene i izražene pomoću $\log P$ i antiagregacijskog učinka izraženog kao MINaAC. Dobivena je negativna korelacija između $\log P$ i MINaAC što se objašnjava činjenicom da što je veća lipofilnost odnosno $\log P$ to je potrebna manja koncentracija za ispoljavanje antiagregacijskog učinka.

U istom istraživanju provodilo se i ispitivanje signalnih puteva za različite induktore agregacije za koje je određena MINaAC za flavanon koji se u ispitivanjima s ADP-om pokazao kao najpotentniji. Za ovu svrhu provedena su ispitivanja flavanona u kombinaciji s poznatim antiagregacijskim lijekovima-inhibitorom PLC U73122, blokatorom kalcijevih kanala verapamilom te inhibitorom COX-1 u trombocitima indometacinom u prisustvu jakog induktora TRAP-6 i slabog induktora agregacije ADP-a. U kombinaciji s verapamilom, pokazano je značajno povećano antiagregacijsko djelovanje u prisutnosti TRAP-6, ali ne i ADP-a. To ukazuje na djelovanje flavanona na putu mobilizacije kalcija, a s obzirom da učinak nije postignut uz ADP pretpostavlja se da flavanon djeluje na mete specifične za TRAP-6 poput Rho-kinaza na što ukazuje i istraživanje koje su proveli Missy i sur. (2001) gdje uz inhibitor Rho-kinaze ubrzo nestaje agregacijski učinak uzrokovan indukcijom agregacije uz TRAP-6. Nadalje, istraživanje Babić i sur. (2019) pokazalo je da indometacin u kombinaciji s flavanonom ne pokazuje povećano smanjenje agregacije u odnosu na sam indometacin što ukazuje da flavanon ne djeluje direktno na COX-1. Flavanon je u kombinaciji s inhibitorom PLC pokazao statistički značajno smanjenje agregacije trombocita za 35% u prisutnosti jakog induktora agregacije TRAP-6 dok je sam flavanon pokazao smanjenje od 14% sam i uz U73122 smanjenje od 25%. U prisutnosti slabog induktora ADP-a djelovanjem kombinacije inhibitora PLC i flavanona, postignuto je smanjenje agregacije trombocita za 50%. Navedeni rezultat

pokazuje značajno djelovanje flavonoida, konkretno flavanona, na jednu od ključnih meta uključenih u agregaciju trombocita-fosfolipazu C. Istraživanje Kitagawe i sur. (1993) te Vlasica i sur. (1993), pokazano je da fluidnost membrane također regulira aktivaciju trombocita. Stoga je postavljena pretpostavka da flavonoidi kao što je već navedeno povećavaju rigidnost membrane, a posljedično smanjuju izlaganje receptora za induktore agregacije na površini što konačno smanjuje aktivaciju i konačno agregaciju trombocita. Yoshida i sur. (2019) istražili su utjecaj promjena u fluidnosti membrane, koja ovisi o sastavu fosfolipida, na aktivnost vezanja liganda za receptore spregnute s G-proteinima. Rezultati su pokazali da je veća fluidnost membrane povezana s pristupnosti aktivne konformacije receptora na površini membrane. S obzirom da je PLC enzim nizvodno od G-proteina s kojim su spregnuti receptori na površini trombocita, smanjenje fluidnosti membrane indirektno dovodi do smanjenja aktivnosti PLC što u konačnici vodi do smanjenja koncentracije kalcija u citosolu i smanjenje aktivacije i agregacije trombocita.

Trenutno ne postoji velik broj istraživanja vezanih uz mehanizam antiagregacijskog učinka flavanona u prisutnosti adrenalina kao induktora agregacije. Istraživanje koje su proveli Rein i sur. (2004) pokazalo je antiagregacijski učinak kakao napitka bogatog epikatehinima i proantocijanidinima šest sati nakon konzumacije ispitivanjem *ex vivo*. U tom istraživanju ciljano je ispitivana ekspresija GP IIb-IIIa integrina na površini trombocita te je primijećena smanjena ekspresija GP IIb-IIIa receptora kod agregacije potaknute slabim induktorima-adrenalinom i ADP-om za razliku od kontrolne grupe u kojoj je konzumiran napitak bez flavonoida. Babić i sur. (2019) proveli protočnu citometriju kojom je također dokazano statistički smanjena ekspresija aktivnih GP IIb-IIIa receptora, ali uz jaki induktor TRAP-6 te je u ovom slučaju bila potrebna viša koncentracija flavanona (488 μM) nego u impedancijskoj agregometriji što se djelomično pripisuje drugačijoj tehnici i uzorku plazme umjesto pune krvi.

Komponente signalnog puta na koje djeluje adrenalin vezanjem za receptore su između ostalog komponente PI3K signalnog puta među koje spada Akt-protein kinaza. Istraživanje Navarra i sur. (2010) otkrilo je da kvercetin pokazuje inhibitorni učinak na pojedine kinaze između ostalog na kinaze uključene u signalni put adrenalina – PI3K i Akt-kinazu. Osim toga adrenalin djeluje i na sintezu cAMP-a. Istraživanje Ok i sur. (2012) dokazalo je povoljan učinak epigallocatehin-3-galata na povišenje razina cAMP-a potenciranjem aktivnosti adenilil-ciklaze koje posljedično dovode do fosforilacije VASP-proteina i održavanja trombocita u stanju mirovanja u prisustvu kolagena kao induktora agregacije.

Promatrajući signalni put preko kojeg adrenalin potiče agregaciju trombocita i dobiven statistički značajan učinak na smanjenje agregacije trombocita moguće je pretpostaviti da flavanon utječe na pojedinu komponentu signalnog puta, ali s obzirom na usporedivost rezultata s ostalim induktorima agregacije moguće je izvesti pretpostavku da je mehanizam antiagregacijskog učinka flavanona u prisutnosti adrenalina, barem djelomično, posljedica stabilizacije membrana trombocita i sprječavanja ispoljavanja dodatnih receptora na površini stanične membrane. Za potpuno objašnjenje mehanizma djelovanja flavanona u prisustvu adrenalina potrebno je provesti dodatna istraživanja.

Erlund i sur. (2001) proveli su istraživanje o koncentraciji naringenina i hesperitina u plazmi nakon konzumacije soka od naranče. Rezultat je za naringenin iznosio $0,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ dok je za hesperetin vrijednost iznosila $2,2 \pm 1,6 \mu\text{M}$. Slično istraživanje proveli su Manach i sur. (2003) te također dobili koncentracije flavanona usporedive s minimalnom antiagregacijskom koncentracijom flavanona. Minimalna koncentracija flavanona koja je pokazala statistički značajan antiagregacijski učinak vrlo je niska i moguće je postići takve vrijednosti flavanona svakodnevnom prehranom bogatom flavanonima. Takva prehrana doprinijela bi smanjenju rizika od aterotrombotičkih događaja uz manje nuspojave u usporedbi s postojećim lijekovima. Također je potrebno dodatno razmotriti učinke flavonoida iz prehrane na laboratorijske pretrage i interakcije s lijekovima.

6. Zaključak

U ovom radu ispitivan je antiagregacijski učinak flavanona na agregaciju trombocita metodom impedancijske agregometrije na Multiplate® uređaju. Impedancijska agregometrija pokazala se brzom i jednostavnom metodom koja zahtjeva male količine uzorka pune krvi bez prethodne obrade što doprinosi većoj točnosti i reproducibilnosti rezultata. Za indukciju agregacije trombocita korišten je adrenalin.

Dobiveni rezultat iskazan je kao MINaAC, odnosno minimalna antiagregacijska koncentracija flavonoida koja uzrokuje statistički značajno smanjenje agregacije trombocita u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Statistička obrada provedena je Studentovim *t*-testom.

Prvi puta je određena MINaAC flavanona uz adrenalin, a iznosi 0,06 μ M. Radi se o vrlo niskoj koncentraciji flavanona koju je moguće ostvariti kroz prehranu.

Dobiveni rezultat usporediv je s već provedenim istraživanjima na flavanonima te se pretpostavlja zajednički antiagregacijski učinak flavanona, neovisan o induktoru, na stabilizaciju membrane trombocita te sprječavanje ispoljavanja dodatnih receptora za agoniste na površini. Mehanizam djelovanja flavanona na signalni put kod agregacije potaknute adrenalinom potrebno je dodatno istražiti.

S obzirom na velik broj oboljenja od kardiovaskularnih bolesti i činjenicu da smo svakodnevno izloženi stresnim situacijama, poželjno je usmjeriti daljnja ispitivanja na terapijske mogućnosti flavanona u prevenciji i liječenju hiperagregabilnih stanja, interakcije s lijekovima i utjecaj na laboratorijske pretrage.

7. Literatura

- Akachi T, Shiina Y, Ohishi Y, Kawaguchi T, Kawagishi H, Morita T, Mori M, Sugiyama K. Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha (*Citrus depressa*) against D-galactosamine-induced liver injury in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2010, 56, 60- 67.
- Al-Ishaq RK, Abotaleb M, Kubatka P, Kajo K, Büsselberg D. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. *Biomolecules*, 2019, 9, 430.
- Andrade PB, Grosso C, Valentao P, Bernardo J. Flavonoids in Neurodegeneration: Limitations and Strategies to Cross CNS Barriers. *Curr Med Chem*, 2016, 23, 4151- 4174.
- Asmis L, Tanner FC, Sudano I, Lüscher TF, Camici GG. DMSO inhibits human platelet activation through cyclooxygenase-1 inhibition. A novel agent for drug eluting stents?. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391, 1629- 1633.
- Aumuller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Mayerhofer A, Mense S, Reissig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spänel-Borowski K, Wennemuth G, Wolff W, Wurzing L, Zilch H. Duale Reihe Anatomija. Zagreb, Medicinska naklada, 2018, str. 169.
- Babić I, Bojić M, Maleš Ž, Zadro R, Gojčeta K, Duka I. Influence of flavonoids' lipophilicity on platelet aggregation. *Acta Pharm*, 2019, 69, 607-619.
- Batra P, Sharma AK. Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. 3 *Biotech*, 2013, 3, 439-459.
- Bojić M, Debeljak Ž, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S. Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutr J*, 2011, 10, 73.
- Cardiovascular diseases (CVDs), 2017., [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)), pristupljeno 1. 4. 2020.
- Calatzis A, Loreth RM, Spannagl M. Multiplate® platelet function analysis - application and interpretation. Munich: Dynabyte GmbH, 2007.
- Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol*, 2012, 3, 141.
- Čović D, Bojić M, Medić-Šarić M. Metabolizam flavonoida i fenolnih kiselina. *Farm glas*, 2009, 65, 693-704.

- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18, 1818-1892.
- Flavanone, 2005., <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flavanone#section=2D-Structure>, pristupljeno 4. 6. 2020.
- Freedman JE, Parker C 3rd, Li L, Perlman J A, Frei B, Ivanov V, Deak L R, Iafrati M D, Folts J D. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation*, 2001, 103, 2792- 2798.
- Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *J Thromb Haemost*, 2008, 99, 466-472.
- Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-García O, Vicente V, Rivera J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *J Thromb Haemost*, 2005, 3, 369- 376.
- Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija, 12. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str. 451-457.
- Harrison P i Lordkipanidzé M. Testing Platelet Function. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2013, 27, 411-441.
- Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*, 1983, 32, 1141- 1148.
- Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology, 14th Edition. McGraw-Hill Education, New York, 2017, str. 619-621.
- King S, Short M, Harmon C. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: The resurgence of tirofiban. *Vascul Pharmacol*, 2016, 78, 10-16.
- Kitagawa S, Orinaka M, Hirata H. Depth-dependent change in membrane fluidity by phenolic compounds in bovine platelets and its relationship with their effects on aggregation and adenylate cyclase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1179, 277- 282.
- Knežević A. Inhibitori ADP-om ovisne agregacije trombocita. *Cardiolog Croat*, 2014, 9, 48-52.
- Kristensen SD, Würtz M, Grove EL, De Caterina R, Huber K, Moliterno DJ, Neumann FJ. Contemporary use of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *J Thromb Haemost*, 2012, 107, 215-224.

- Kumar S, Pandey K.A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J*, 2013, 2013, 1-16.
- Lam S, Tran T. Vorapaxar: A Protease-Activated Receptor Antagonist for the Prevention of Thrombotic Events. *Cardiol Rev*, 2015, 23, 261-267.
- Leslie M. Beyond clotting: the powers of platelets. *Science*, 2010, 328, 562-564.
- Lievens D, Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis. *Thromb Haemost*, 2011, 106, 827-838.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727-747.
- Martin AC, Zlotnik D, Bonete GP, Baron E, Decouture B, Belleville-Rolland T, Le Bonniec B, Poirault-Chassac S, Alessi MC, Gaussem P, Godier A, Bachelot-Loza C. Epinephrine restores platelet functions inhibited by ticagrelor: A mechanistic approach. *Eur J Pharmacol*, 2019, 866, 172798.
- McFadyen JD, Schaff M, Peter K. Current and future antiplatelet therapies: emphasis on preserving haemostasis. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15, 181-191.
- Missy K, Plantavid M, Pacaud P, Viala C, Chap H, Payrastre B. Rho-kinase is involved in the sustained phosphorylation of myosin and the irreversible platelet aggregation induced by PAR1 activating peptide. *Thromb Haemost*, 2001, 85, 514- 520.
- Multiplate®, 2015., <https://www.haemoview.com.au/multiplate>, pristupljeno 5. 4. 2020.
- Navarro-Núñez L, Lozano ML, Martínez C, Vicente V, Rivera J. Effect of quercetin on platelet spreading on collagen and fibrinogen and on multiple platelet kinases. *Fitoterapia*, 2010, 81, 75- 80.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74, 418- 425.
- Nishiumi S, Miyamoto S, Kawabata K, Ohnishi K, Mukai R, Murakami A, Ashida H, Terao J. Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors. *Front Biosci*, 2011, 3, 1332- 1362.
- Ok WJ, Cho HJ, Kim HH, Lee DH, Kang HY, Kwon HW, Rhee MH, Kim M, Park HJ. Epigallocatechin-3-gallate has an anti-platelet effect in a cyclic AMP-dependent manner. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19, 337- 348.

- Patrono C, Baigent C. Role of aspirin in primary prevention of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16, 675-686.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corrà U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FD, Løchen ML, Löllgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, Worp HB, Dis I, Verschuren M, Binno S. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*, 2016, 37, 2315-2381.
- Pignatelli P, Pastori D, Farcomeni A, Nocella C, Bartimoccia S, Vicario T, Bucci T, Carnevale R, Violi F. Mediterranean diet reduces thromboxane A₂ production in atrial fibrillation patients. *Clin Nutr*, 2015, 34, 899- 903.
- Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72, 30- 35.
- Reiner Ž. Ateroskleroza – bolest od koje umire svaki drugi Hrvat. Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad, Požega, 2012, 169-174.
- Renaud S, Langeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 1992, 339, 1523-1526.
- Rogers KC, Oliphant CS, Finks SW. Clinical efficacy and safety of cilostazol: a critical review of the literature. *Drugs*, 2015, 75, 377-395.
- Saeed SA, Rasheed H, Fecto FAW, Achakzai MI, Ali R, Connor JD, Gilani AH. Signaling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25, 887-892.
- Spalding A, Vaitkevicius H, Dill S, MacKenzie S, Schmaier A, Lockette W. Mechanism of epinephrine-induced platelet aggregation. *Hypertension*, 1998, 31, 603- 607.
- Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R, Diamond SL, Brass LF. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood*, 2013, 121, 1875-1885.
- Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH. Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. *J Am Coll Surg*, 2006, 202, 813- 825.
- Vaitkevicius H, Turner I, Spalding A, Lockette W. Chloride increases adrenergic receptor-mediated platelet and vascular responses. *Am J Hypertens*, 2002, 15, 492- 498.

- van Dijk C, Driessen AJ, Recourt K. The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochem Pharmacol*. 2000, 60, 1593- 1600.
- Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev*, 2013, 93, 327-358.
- Vlasic N, Medow MS, Schwarz SM, Pritchard KA, Stemerman MB. Lipid fluidity modulates platelet aggregation and agglutination in vitro. *Life Sci*, 1993, 53, 1053- 1060.
- Yoshida K, Nagatoishi S, Kuroda D, Suzuki N, Murata T i Tsumoto K. Phospholipid Membrane Fluidity Alters Ligand Binding Activity of a G Protein-Coupled Receptor by Shifting the Conformational Equilibrium. *Biochemistry*, 2019, 58, 504–508.

8. Sažetak

SAŽETAK

Trombociti imaju značajnu ulogu u kardiovaskularnim bolestima, a u osoba s povišenim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti pokazuju svojstva pojačane aktivnosti i hiperagregabilnosti. Uz antiagregacijsku terapiju često se vežu pojave rezistencije i nuspojava. Flavonoidi su polifenoli biljnog porijekla koji pokazuju različita biološka djelovanja među kojima je i antiagregacijsko djelovanje. Francuski i azijski paradoks primjer su učinka flavonoida na prevenciju razvoja kardiovaskularnih bolesti.

U ovom radu ispitan je *in vitro* antiagregacijski učinak flavanona uz adrenalin kao induktor agregacije. Istraživanje je provedeno metodom impedancijske agregometrije na uređaju Multiplate®. Korišteni su uzorci pune krvi dobrovoljnih davatelja krvi koji ne uzimaju antiagregacijsku terapiju uz potpisani informirani pristanak.

Mjerenjem su dobiveni grafovi ovisnosti agregacije trombocita o vremenu, a za svaku krivulju izračunata je površina ispod krivulje. Rezultat je iskazan kao minimalna antiagregacijska koncentracija flavonoida koja statistički značajno smanjuje agregaciju trombocita (MINaAC). Određena MINaAC flavanona u agregaciji trombocita potaknutoj adrenalinom iznosi 0,06 μ M.

Dobiveni rezultat u kontekstu je postojećih istraživanja o antiagregacijskom učinku flavanona uz druge induktore agregacije. Moguće je pretpostaviti da osim djelovanja na pojedine signalne puteve postoji nespecifičan mehanizam djelovanja flavanona na stabilizaciju membrane trombocita.

Potrebno je dodatno istražiti specifično djelovanje flavanona na signalne puteve u agregaciji trombocita potaknutoj adrenalinom. Određenu MINaAC moguće je postići u prehrani te je poželjno dodatno ispitati terapijske mogućnosti flavanona, ali i interakcije s lijekovima i laboratorijskim pretragama.

SUMMARY

Platelets play a significant role in cardiovascular diseases. In people with a higher cardiovascular risk, platelets are found in hyperactive and hyperaggregable state. Antiplatelet drugs are often related to resistance and have side effects. Flavonoids are polyphenolic compounds found in plants and exhibit a variety of biological effects, including antiaggregatory effect. French and Asian paradox are examples of the beneficial effect of flavonoids in the prevention of cardiovascular diseases.

This thesis studies *in vitro* antiaggregatory effect of flavanone on aggregation induced with epinephrine. The method used for measurement of antiaggregatory effect was impedance aggregometry and the instrument used was Multiplate® analyzer. Samples of blood were collected from blood-givers who were not on any antiaggregatory therapy and who gave their written and informed consents.

Measurements showed a platelet aggregation curve in dependence of time, and area under curve was calculated for every sample. The result was expressed as minimal antiaggregatory concentration (MINaAC), which significantly reduces platelet aggregation. The determined value of MINaAC for flavanone in epinephrine induced platelet aggregation is 0,06 μ M.

The final result is comparable to existing research papers on antiaggregatory effect of flavanone when aggregation is induced with different inducers. It is possible to assume that with the exception of affecting signal pathways, flavanones exhibit a non-specific mechanism, which includes the stabilization of the platelet membrane.

Specific antiaggregatory mechanism of flavanone on epinephrine induced aggregation should be examined. The determined value of MINaAC is achievable through dietary implementations. Possible therapeutical options, drug interactions and altering the laboratory test results should be examined within future research.

9. Prilog

INFORMIRANI PRISTANAK

DIPLOMAND: REGINA HORVAT, studentica
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
e-mail: rhorvat@student.pharma.hr

MENTOR: izv. prof. dr. sc. Mirza Bojić
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
e-mail: mbojic@pharma.hr

NEPOSREDNI MENTOR: IVANA BABIĆ, mag. med. biochem.
Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
e-mail: ivana.babaic@hztm.hr

Naziv istraživanja: „Utjecaj flavanona na agregaciju potaknutu adrenalinom“

Poštovana/poštovani,

Pozivamo Vas da sudjelujete u znanstvenom istraživanju u kojem će se ispitivati antiagregacijsko djelovanje flavonoida. Molimo Vas da pažljivo pročitate ovaj informirani pristanak jer su u njemu sadržani podaci koji će Vam pomoći da odlučite želite li sudjelovati u ovom znanstvenom istraživanju, te zašto i kako se ono provodi. U slučaju da neke dijelove sadržaja ne razumijete, molimo Vas da se s pitanjima obratite doktorandu koji vodi ovo znanstveno istraživanje ili liječniku na uzimanju krvi.

Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljnom svijetu i uobičajeni su sastojci svakodnevne prehrane (propolis, vino, zeleni čaj, kakao, čokolada i ginko). Mnogi metaboliti flavonoida pokazali su raznoliku biološku aktivnost *in vitro*: antibakterijsku, antiviralnu, antikancerogenu, protuupalnu i antiagregacijsku. Iako je opisano njihovo inhibitorno djelovanje *in vitro* na enzime uključene u aktivaciju i agregaciju trombocita, jedinstveni mehanizam antiagregacijskog djelovanja flavonoida još nije utvrđen.

Cilj istraživanja

Proučavanje flavonoida i njihovog inhibitornog učinka na agregaciju važno je zbog razvoja novih antiagregacijskih terapija i mogućeg smanjenja nuspojava tih terapija budući se radi o sastojcima svakodnevne prehrane. S tim ciljem a za potrebe istraživanja potrebno je prilikom uzimanja krvi za druge pretrage uzeti dodatno jedan uzorak krvi (4,5 mL) s Na-citratom kao antikoagulansom iz koje bi se radila agregacijska ispitivanja i ispitivanja aktivacije trombocita

uz dodatak flavonoida i različitih agonista zgrušavanja. Nema dodatnog rizika koji proizlazi iz provedbe ove studije.

Vaša uloga u ovom znanstvenom istraživanju

Za pristupnika je važno da ne uzima nikakvu terapiju protiv agregacije trombocita. Ako se složite sa sudjelovanjem u istraživanju, prilikom vađenja krvi za druge testove bit će Vam uzeti jedan uzorak krvi s citratom kao antikoagulansom. Vaš identitet bit će zaštićen na način da će Vaš potpisani informirani pristanak moći pregledati samo medicinski djelatnici koji sudjeluju u istraživanju, predstavnici Etičkog povjerenstva u našoj ustanovi i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Podaci dobiveni istraživanjem mogu imati znanstvenu vrijednost, te će u tom slučaju biti objavljeni u znanstvenim publikacijama, pri čemu će Vaš identitet ostati anoniman.

Istraživanje se provodi u skladu s načelima dobre kliničke prakse (Helsinška deklaracija, Zakon o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakon o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04)). Vaše sudjelovanje u ovom istraživanju je dobrovoljno. Ako odlučite sudjelovati, potrebno je potpisati informirani pristanak, pri čemu jedan primjerak ostaje kod Vas.

Hvala Vam što ste pročitali ovaj dokument i razmotrili sudjelovanje u ovom znanstvenom istraživanju.

Ako ste odlučili sudjelovati, molimo Vas da potpišete informirani pristanak.

Potvrđujem da sam (datum_____, Zagreb) pročitala obavijest za navedeno znanstveno istraživanje: **«Utjecaj flavanona na agregaciju potaknutu adrenalinom»** te sam imao/imala priliku postavljati pitanja. Želim sudjelovati u navedenom znanstvenom istraživanju.

Ime i prezime (štampano)_____

Potpis: _____

Datum:_____

Liječnik koji je vodio postupak za informirani pristanak:

Ime i prezime (štampano)_____

Potpis: _____

Datum:_____

Za dodatne podatke slobodno se obratite diplomandu ili mentorima koji vode istraživanje.

**10. Temeljna dokumentacijska kartica/
Basic documentation card**

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Utjecaj flavanona na agregaciju trombocita potaknutu adrenalinom

Regina Horvat

SAŽETAK

Trombociti imaju značajnu ulogu u kardiovaskularnim bolestima, a u osoba s povišenim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti pokazuju svojstva pojačane aktivnosti i hiperagregabilnosti. Uz antiagregacijsku terapiju često se vežu pojave rezistencije i nuspojava. Flavonoidi su polifenoli biljnog porijekla koji pokazuju različita biološka djelovanja među kojima je i antiagregacijsko djelovanje. Francuski i azijski paradoks primjer su učinka flavonoida na prevenciju razvoja kardiovaskularnih bolesti.

U ovom radu ispitan je in vitro antiagregacijski učinak flavanona uz adrenalin kao induktor agregacije. Istraživanje je provedeno metodom impedancijske agregometrije na uređaju Multiplate®. Korišteni su uzorci pune krvi dobrovoljnih davatelja krvi koji ne uzimaju antiagregacijsku terapiju uz potpisani informirani pristanak.

Mjerenjem su dobiveni grafovi ovisnosti agregacije trombocita o vremenu, a za svaku krivulju izračunata je površina ispod krivulje. Rezultat je iskazan kao minimalna antiagregacijska koncentracija flavonoida koja statistički značajno smanjuje agregaciju trombocita (MINaAC). Određena MINaAC flavanona u agregaciji trombocita potaknutoj adrenalinom iznosi 0,06 μ M.

Dobiveni rezultat u kontekstu je postojećih istraživanja o antiagregacijskom učinku flavanona uz druge induktore agregacije. Moguće je pretpostaviti da osim djelovanja na pojedine signalne puteve postoji nespecifičan mehanizam djelovanja flavanona na stabilizaciju membrane trombocita.

Potrebno je dodatno istražiti specifično djelovanje flavanona na signalne puteve u agregaciji trombocita potaknutoj adrenalinom. Određenu MINaAC moguće je postići u prehrani te je poželjno dodatno ispitati terapijske mogućnosti flavanona, ali i interakcije s lijekovima i laboratorijskim pretragama.

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

Rad sadrži: 53 stranice, 13 grafičkih prikaza, 2 tablice i 54 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: agregacija trombocita, flavonoidi, impedancijska agregometrija

Mentor: **Dr. sc. Mirza Bojić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Mirza Bojić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ivana Babić, *Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu.*

Dr. sc. Goran Benković, *Agencija za lijekove i medicinske proizvode.*

Rad prihvaćen: lipanj 2020.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

The effect of flavanone on epinephrine induced platelet aggregation

Regina Horvat

SUMMARY

Platelets play a significant role in cardiovascular diseases. In people with a higher cardiovascular risk, platelets are found in hyperactive and hyperaggregable state. Antiplatelet drugs are often related to resistance and have side effects. Flavonoids are polyphenolic compounds found in plants and exhibit a variety of biological effects, including antiaggregatory effect. French and Asian paradox are examples of the beneficial effect of flavonoids in the prevention of cardiovascular diseases.

This thesis studies *in vitro* antiaggregatory effect of flavanone on aggregation induced with epinephrine. The method used for measurement of antiaggregatory effect was impedance aggregometry and the instrument used was Multiplate® analyzer. Samples of blood were collected from blood-givers who were not on any antiaggregatory therapy and who gave their written and informed consents.

Measurements showed a platelet aggregation curve in dependence of time, and area under curve was calculated for every sample. The result was expressed as minimal antiaggregatory concentration (MINaAC), which significantly reduces platelet aggregation. The determined value of MINaAC for flavanone in epinephrine induced platelet aggregation is 0,06 μ M.

The final result is comparable to existing research papers on antiaggregatory effect of flavanone when aggregation is induced with different inducers. It is possible to assume that with the exception of affecting signal pathways, flavanones exhibit a non-specific mechanism, which includes the stabilization of the platelet membrane.

Specific antiaggregatory mechanism of flavanone on epinephrine induced aggregation should be examined. The determined value of MINaAC is achievable through dietary implementations. Possible therapeutical options, drug interactions and altering the laboratory test results should be examined within future research.

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

Thesis includes: 53 pages, 13 figures, 2 tables and 54 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Platelet aggregation, flavonoids, impedance aggregometry

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

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

Ivana Babić, Ph.D., Croatian Institute for Transfusion Medicine

Goran Benković, Ph.D., Agency for Medicinal Products and Medical Devices

The thesis was accepted: June 2020.

