Određivanje antiagregacijskog učinka etanolnih ekstrakata lista matičnjaka

Novaković, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:999879

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Ivan Novaković

Određivanje antiagregacijskog učinka etanolnih ekstrakata lista matičnjaka

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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 doc. dr. sc. Mirze Bojića

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Mirzi Bojiću na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima pri izradi ovog rada, prof. dr. sc. Željanu Malešu na uzrocima matičnjaka, Andrei Antolić, univ.mag.pharm. i Ivani Babić, mag. med. biochem., unutar čije je doktorske disertacije izveden ovaj diplomski rad te Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu gdje je učinjen eksperimentalni dio ovog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. MATIČNJAK (*Melissa officinalis L., Lamiaceae*) 3

1.2. FLAVONOIDI 4

1.3. FARMAKOKINETIKA I BIOLOŠKI UČINCI FLAVONOIDA 6

1.4. HEMOSTAZA 9

1.5. ANTIAGREGACIJSKA TERAPIJA 12

1.6. TESTOVI AGREGACIJE TROMBOCITA 14

2. OBRAZLOŽENJE TEME 15

3. MATERIJALI I METODE 17

3.1.1. UZORCI 18

3.1.2. STANDARDI 18

3.1.3. KEMIKALIJE 19

3.1.4. INSTRUMENTI I LABORATORIJSKI PRIBOR 19

3.1.5. METODE 20

3.1.6. PROVEDBA TESTA AGREGACIJE TROMBOCITA 22

4. REZULTATI 23

5. RASPRAVA 31

6. ZAKLJUČAK 36

7. LITERATURA 38

8. SAŽETAK/SUMMARY 43

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD 46

1. UVOD

Kardiovaskularne su bolesti postale javnozdravstveni problem širom planeta. Dug životni i radni vijek, stres, manjak tjelesne aktivnosti, nezdrava prehrana te pušenje značajno povećavaju učestalost oboljenja krvožilnog sustava u populaciji. Posljedica toga jest rastuće opterećenje zdravstvenih sustava uz nemjerljivu ekonomsku štetu (www.who.int). Kako ta oboljenja uzrokuju smrt ili doživotnu terapiju lijekovima, pronalaženje učinkovite i sigurne farmakoterapije je postalo iznimno važno. Postojeća je farmakoterapija u nekim slučajevima skupa te popraćena neugodnim i ponekad opasnim nuspojavama. Stoga se traga za sigurnijim i učinkovitijim lijekovima (www.halmed.hr).

Istraživanjima su utvrđena razna povoljna djelovanja polifenolnih spojeva. Oni u biljkama imaju mnoge uloge, a njihov je blagotvorni učinak na krvožilni sustav poznat duže vrijeme. Imaju antioksidativno i protuupalno (Cassidy i sur., 2015; Hidalgo i sur., 2012; Frei i Higdon, 2003; Spencer i sur., 2001), antihipertenzivno (Guerrero i sur., 2012; Hidalgo i sur., 2012), antiagregacijsko (Chen i sur., 2013; Pearson i sur., 2002), antimutageno i protutumorsko (Suh i sur., 2009; Haddad i sur., 2006; Yamagishi i sur., 2002), antidijabetičko (Babu i sur., 2013; Hanhineva i sur., 2010) i neuroprotektivno (Vauzour i sur., 2008; Spencer i sur., 2001) djelovanje, a sigurni su pri konzumaciji. Ta su im svojstva priskrbila interes znanstvene zajednice koja ih pokušava iskoristiti za razvoj novih lijekova.

Matičnjak (*Melissa officinalis* L., *Lamiaceae*) je biljka južne Europe i Mediterana gdje se koristi u kulinarstvu kao začin. Poznata je po svome eteričnom ulju koje ima ugodan i smirujući miris na limun. U svojim listovima, osim eteričnog ulja, biljka sadrži i raznolike polifenolne spojeve koji imaju blagotvorna djelovanja na zdravlje ljudi (Kuštrak, 2005). Sadržaj listova moguće je ekstrahirati. Ispitivanjima je zamijećeno da ekstrakti listova imaju protutumorsko, antioksidativno i neuroprotektivno djelovanje (Encalada i sur., 2011; Obulesu i Rao, 2011; Pereira i sur., 2009). Ispitivanjima na miševima su dokazana i druga značajna povoljna djelovanja.

Svrha je ovog rada proučiti utjecaj etanolnih ekstrakata listova matičnjaka na agregaciju trombocita i to *in vitro* metodom impedancijske agregometrije koristeći uređaj Multiplate® Analyser.

1.1. MATIČNJAK (*Melissa Officinalis* L., *Lamiaceae*)

Matičnjak je samonikla biljka Mediterana pa tako i primorskog dijela Hrvatske. Može se naći u prirodi ili uzgoju. Od matičnjaka se koriste njegovi, prije cvatnje prikupljeni i osušeni listovi, dok se za proizvodnju eteričnog ulja koriste svježi vršni dijelovi biljke. Destilacijom vodenom parom svježih vršnih dijelova matičnjaka dobiva se eterično ulje – *Melissae aetheroleum*. To je bistra, bezbojna ili žućkasta tekućina ugodnog mirisa na limun. Kako ga biljka proizvodi malo, ono je vrlo skupo te se često patvori. Moguća je i destilacija eteričnog ulja limuna preko zeleni matičnjaka čime se dobiva smjesa eteričnih ulja koja se naziva *Melissae citratum aetheroleum*.

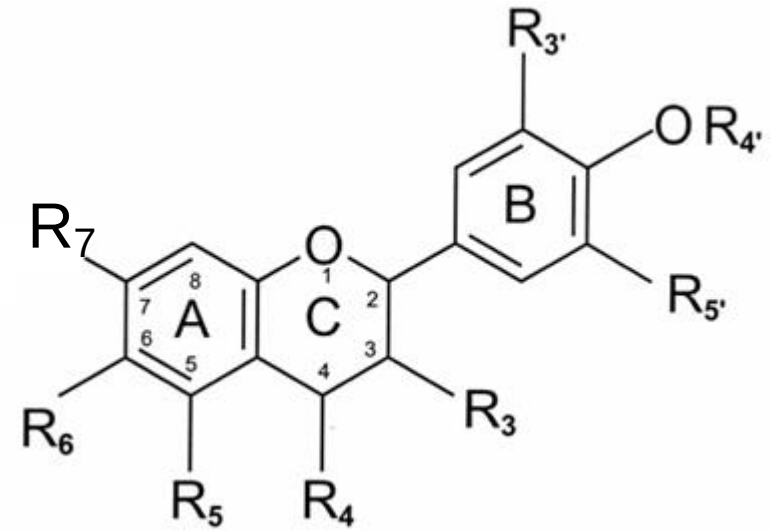
Kemijski je sastav listova i eteričnog ulja matičnjaka ovisan o podneblju u kojem je biljka rasla te o obradi biljke nakon branja. Glavne sastavnice eteričnog ulja matičnjaka kojeg u listu ima od 0,02-0,03% su geranial i neral (citral a i b) te (+)-citronelal. Eterično ulje također sadrži citronelol, linalol i geraniol. Navedene sastavnice su monoterpeni, a od seskviterpena se u ulju mogu naći kariofilen te germakren. Uz eterično ulje list matičnjaka sadrži i fenilkarbonske kiseline i to slobodnu ili glikozidno vezanu klorogensku i kavenu kiselinu, *p*-kumarnu te oko 4% ružmarinske kiseline i manje količine triterpena, mineralnih tvari i flavonoida (Arceusz i Weselowski, 2015; Kuštrak, 2005; Patora i Klimek, 2002). Neki od prisutnih flavonoida su apigenin, luteolin, (Patora i Klimek, 2002) rutin, miricetin, kvercetin i kemferol (Arceusz i Weselowski, 2015).

Najstariji pripravak od matičnjaka koji se koristi je Karmelićanska voda (*Spiritus melissae compositus*) čiji je recept tajna. List matičnjaka se može koristiti za izradu tekućih i čvrstih ljekovitih pripravaka za unutarnju i vanjsku upotrebu. Sastavnica je medicinskih čajeva koji djeluju kao sedativi, stomahici i spazmolitici. Utvrđeno je antiagregacijsko djelovanje eteričnog ulja (Hsiu – Fang i sur., 2012) te njegov povoljan učinak na glikemijski profil miševa (Chung i sur., 2010). Vodeni ekstrakt listova ima antivirusno djelovanje, a smatra se da je za njega zaslužna ružmarinska kiselina i drugi polifenoli pa se ekstrakt matičnjaka u hidrofilnoj masnoj podlozi koristi i kao tretman za groznicu usana (Kuštrak, 2005). Ružmarinska kiselina ima antiagregacijsko djelovanje (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) te potiče apoptozu stanica karcinoma kolona *in vitro* (Encalada i sur., 2011). Ispitivanjem učinka ekstrakta lista matičnjaka na kulture retinalnih pigmentnih epitelnih stanica utvrđeno je smanjenje štetnog učinka reaktivnih kisikovih spojeva na te stanice (Jeung i sur., 2016). Sličan antioksidativni učinak primijećen je i u tkivu mozga štakora (Pereira i sur., 2009).

1.2. FLAVONOIDI

Flavonoidi su heterogena porodica polifenolnih spojeva koji se sintetiziraju u biljkama, a običan čovjek ih susreće gotovo svakodnevno: u obojenom povrću, vinu ili cvijeću. Ti su polifenoli bitni za život biljke gdje obavljaju niz zadaća koje uključuju zaštitu biljke od mikroba, regulaciju rasta biljnih stanica, prilagodbe uvjetima okoline ili privlače kukce. Životinje ih ne mogu sintetizirati. U biljkama se nalaze u gotovo svim dijelovima, a svakako su najočitiji kao pigmenti cvjetova i plodova. Sve funkcije flavonoida u biljci tek se trebaju rasvijetliti (Kumar i Pandey, 2013).

Po svojoj strukturi flavonoidi su hidroksilirani derivati benzopirana s vezanom fenilnom skupinom na položaju 2 ili 3. Na slici 1 prikazana je opća strukturna formula flavonoida i na njoj je vidljivo da se skelet sastoji od dvije benzenske jezgre (prsten A i B) povezne propanskim lancem, a on s atomom kisika tvori dodatni šesteročlani prsten (prsten C). Skupine flavonoida se razlikuju po položaju prstena B te supstituentima na prstenu C i njegovome stupnju oksidacije, a razlike unutar skupina flavonoida proizlaze iz razlika u supstituentima na prstenju A i B. Flavonoidi mogu postojati kao aglikoni, glikozidi ili metilirani derivati. Šećeri koji se nalaze u glikozidima mogu biti glukoza, ramnoza, glukoramnoza, galaktoza i arabinoza (Kumar i Pandey, 2013; Havsteen, 2002).

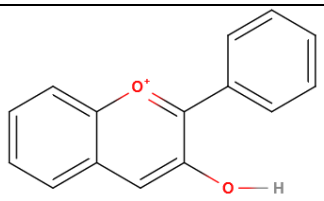
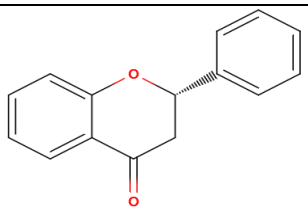
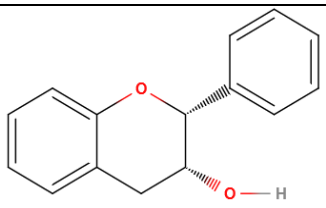
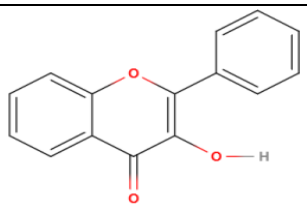
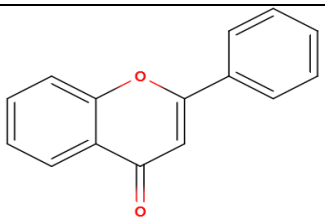
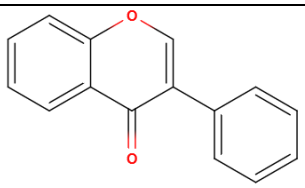


Slika 1: Opća strukturna formula flavonoida

Flavonoidi se mogu kategorizirati u šest skupina važnih za ljudsku prehranu, a njihove strukturne formule prikazane su u tablici 1. Kao što je rečeno, flavonoidi egzistiraju u obliku glikozida te se kao takvi i unose u organizam. Iznimka ovome su flavan-3-oli i spojevi koji su bili podvrgnuti fermentacijskom djelovanju onih vrsta bakterija koje pokazuju glikozidaznu aktivnost. Hidroliza glikozida moguća je i tijekom industrijske obrade namirnica. Šest prehrambeno bitnih potporodica flavonoida i neki njihovi izvori su:

1) antocijanidini iz bobičastog voća od kojeg se najčešće konzumira grožđe, pa se tako antocijanidini nalaze u vinu, a može ih se još naći u crvenome kupusu,
2) flavan-3-oli se nalaze u grožđu, kori crvenih jabuka, marelicama, čajevcu te proizvodima od ploda kakaovca,
3) flavoni koji se nalaze u začinskim biljkama kao što su timijan, celer, origano te metvica,
4) flavanoni koji su zastupljeni u sokovima ploda citrusa,
5) flavonoli koji se nalaze u brokuli, jabukama, čajevcu te bobičastom voću,
6) izoflavoni koji se nalaze u mahunarkama (Kumar i Pandey, 2013; Manach i sur., 2004).

Tablica 1: Prikaz strukturnih formula podskupina flavonoida najvažnijih u ljudskoj prehrani

PORODICA	SKELET	PORODICA	SKELET
Antocijanidin		Flavanon	
Flavan-3-ol		Flavonol	
Flavon		Izoflavon	

1.3. FARMAKOKINETIKA I BIOLOŠKI UČINCI FLAVONOIDA

Ponašanje flavonoida u tijelu obilježeno je dvama uočljivim značajkama: malenom bioraspoloživošću te malenim, mikromolarnim koncentracijama koje postižu u krvi. Malena je bioraspoloživost posljedica opsežnog metabolizma koji započinje posredstvom crijevne mikroflore, a nakon toga se metabolizam nastavlja u tankom crijevu i jetri gdje se flavonoidi i njihovi metaboliti konjugiraju. Jedna od prvih reakcija po dolasku u crijevo jest hidroliza glikozida. Iako se aglikon brzo apsorbira, crijevna mikroflora ga također može metabolizirati sve do jednostavnih aromatskih spojeva koji se apsorbiraju u krvotok, a izlučuju se ili nepromijenjeni ili konjugirani putem urina ili žuči. Najbolje se apsorbiraju izoflavoni, dok se antocijanidini najlošije apsorbiraju (Rothwell i sur., 2016; Manach i sur., 2004).

Vezanost za proteine plazme uvjetovana im je kemijskom strukturom te će se metilirani metaboliti koji su lipofilniji bolje vezati za proteine plazme dok glukuronidacijom taj afinitet pada uslijed povećanja hidrofilnosti molekule te se one kao takve brže eliminiraju iz organizma (Xiao i Kai, 2012). Zamijećena je i njihova interakcija s efluks pumpama – ABC porodicom proteina od koje su zastupljeni P-glikoproteini, MRP-ovi (engl. *multidrug resistance proteins*) i BCRP-ovi (engl. *breast cancer-resistant proteins*) pa tako mogu modulirati svoju bioraspoloživost (Jiang i Hu, 2012).

Uz pojam flavonoida najčešće se veže antioksidativno djelovanje (Frei i Higdon, 2003; Spencer i sur., 2001). Jedno od svojstava flavonoida je keliranje atoma željeza i bakra koji su katalizatori u reakcijama nastajanja reaktivnih kisikovih spojeva (Frei i Higdon, 2003). Iako iz njihove policikličke strukture bogate delokaliziranim elektronima proizlazi činjenica da i oni sami imaju dobro antioksidativno djelovanje, njihov brz metabolizam i eliminacija onemogućavaju postizanje koncentracija u krvnoj plazmi kakve imaju drugi antioksidansi (Williams i sur., 2004). Izgledno je da je zamijećen antioksidativni učinak u *in vivo* istraživanjima na ljudima posljedica modulacije unutarstaničnih signalnih puteva (Williams i sur., 2004; Frei i Higdon, 2003). Kako flavonoidi podliježu opsežnom metabolizmu treba uzeti u obzir i taj utjecaj na njihov biološki učinak. Stoga su *in vitro* ispitivanja antioksidativnog učinka flavonoida vjerojatno ograničenog značaja (Lotito i sur., 2011). Neki flavonoidi imaju dokazano protuupalno djelovanje (Cassidy i sur., 2015).

Utvrđeno je da flavonoidi mogu modulirati metabolizam ugljikohidrata i povećati lučenje inzulina iz β stanica Langerhansovih otočića i usporiti njihovo odumiranje. Smanjuju

inzulinsku rezistenciju i povećavaju unos glukoze u stanice mišića i masnog tkiva u kojima još dodatno smanjuju upalu i oksidativni stres. Posljedično se uočavaju niže razine glukoze u krvi natašte i nakon jela (Babu i sur., 2013; Hanhineva i sur., 2010). Flavonoidi također smanjuju produkciju glukoze na razini jetre. Pretpostavka je da je za ova djelovanja zaslužna sposobnost flavonoida da moduliraju unutarstanične signalne puteve. Ispitivanja kojima su uočena ova djelovanja su provedena *in vitro*, a dosadašnja animalna istraživanja i epidemiološke studije ih potvrđuju. Zapravo, uočeno antidijabetičko djelovanje je usporedivo s učinkom konvencionalnih hipoglikemika (Babu i sur., 2013).

Što se tiče ispitivanja potencijalnih neuroprotektivnih učinaka, uočeno je da flavonoidi sprječavaju lipidnu peroksidaciju u moždanome tkivu, smanjuju upalu modulirajući intraneuronalne signalne puteve te povećavaju otpornost neurona na toksine, povećavaju njihovu plastičnost te produljuju njihov životni vijek. Također potiču neurogenezu i angiogenezu u mozgu (Vauzour i sur., 2008; Spencer i sur., 2001). Aglikoni flavonoida se u tijelu glukuronidiraju i takve velike molekule vrlo teško ulaze u neurone, ali ne može se u potpunosti isključiti mogućnost da se u uvjetima upale ti glukuronidi hidroliziraju, što bi povećalo sposobnost ulaska flavonoida u neurone (Spencer i sur., 2001).

Protutumorsko djelovanje flavonoida je uvelike nerazjašnjeno. Iako je koncentracija flavonoida u krvi, a pogotovo u tkivima mala (Rothwell i sur., 2016; Manach i sur., 2004) vjeruje se da je i ta mala koncentracija tih spojeva u stanicama dovoljna da interferira u staničnoj signalizaciji, a time i ekspresiji određenih gena. Flavonoidi mogu omesti rast stanica karcinoma kolona i uzrokovati njihovu apoptozu, što je uočeno u *in vitro* ispitivanjima. Također induciraju arest u staničnim kulturama karcinoma prostate i to u koncentracijama nižim od onih koje su potrebne za indukciju aresta zdravih stanica. Flavonoidi koji se nalaze u ekstraktu kakaovca su snažni antimutageni *in vitro* i inhibitori nastanka raka gušterače što je uočeno u *in vivo* testiranjima (Suh i sur., 2009; Haddad i sur., 2006; Yamagishi i sur., 2002).

Što se tiče prevencije kardiovaskularnih bolesti, dokazano je da flavonoidi zaista zamjetno smanjuju njihovu pojavnost, međutim još nije pouzdano utvrđeno koji flavonoidi i na koji način sudjeluju u prevenciji tih bolesti. Mnogi su blagotvorni učinci flavonoida na kardiovaskularni sustav. Ispitivanjem učinka flavonoida jabuke na miševima uočeno je da se smanjuje produkcija proupalnog prostaglandina E2 i drugih proupalnih faktora i da se smanjuje ekspresija staničnih receptora za neke proupalne faktore (Espley i sur., 2014). Drugim istraživanjima utvrđen je antiaterogeni učinak i pozitivan učinak na endotelnu

funkciju (Sansone i sur., 2015; Hidalgo i sur., 2012). Također je u *in vitro* ispitivanjima dokazano da su flavonoidi inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima (Guerrero i sur., 2012; Hidalgo i sur., 2012). U kliničkim ispitivanjima na zdravim sredovječnim ljudima uočeno je određeno smanjenje krvnog tlaka, poboljšanje endotelne funkcije i lipidnog profila što je rezultiralo smanjenjem desetogodišnjeg rizika od fatalnih kardiovaskularnih događaja (Sansone i sur., 2015).

Ispitivanjem učinka flavonoida čajevca na agregaciju trombocita u miševima uočena je značajna inhibicija agregacije i znatno produljenje vremena krvarenja (Chen i sur., 2013). *Ex vivo* ispitivanja na krvi ljudi u koju je dodan ekstrakt kakaovca pokazala su inhibiciju agregacije trombocita, ali ona nije bila toliko intenzivna kao inhibicija agregacije uzrokovana acetilsalicilnom kiselinom (Pearson i sur., 2002). Flavonoidi kvercetin i katehin sinergistički inhibiraju agregaciju trombocita (Pignatelli i sur., 2000).

Iako su utjecaji ovih biljnih spojeva na progresiju neurodegenerativnih procesa ili na dijabetes interesantni, napredovanje tih procesa uglavnom je polagano. Većina kardiovaskularnih bolesti su kronično oboljenje, ali njihove komplikacije iako očekivane događaju se naprasno. Infarkt miokarda, plućna embolija ili moždani udar su komplikacije koje se nastoji izbjeći, a u svrhu prevencije koristi se antiagregacijska terapija.

1.4. HEMOSTAZA

Krvožilni sustav dopire do svake stanice u tijelu te joj doprema kisik i hranjive tvari, a odvodi ugljikov dioksid i štetne metabolite. Takav sustav zahtijeva da je krv u tekućem stanju te da krvne žile dopiru do svih dijelova tijela. Važno je da krvožilni sustav rijetko biva narušen u smislu puknuća krvne žile i istjecanja znatnije količine krvi. Sustav kojim se sprječava krvarenje naziva se hemostaza.

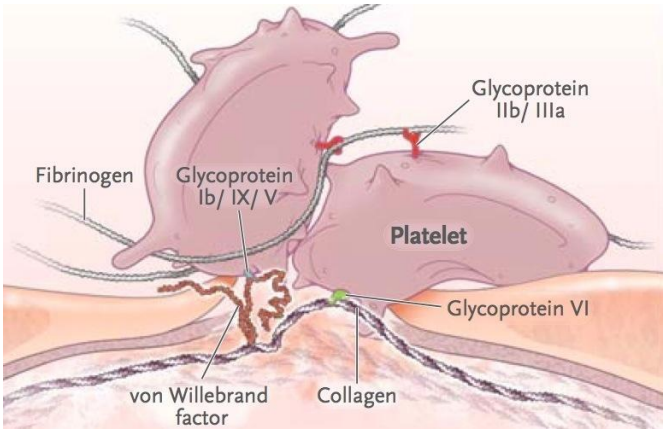
Čitav je sustav hemostaze sastavljen od endotela žila koji na svojoj površini ima tvari koje sprječavaju agregaciju trombocita i koagulaciju krvi te tvari u samim endotelnim stanicama i u dubljim dijelovima žile koje aktiviraju agregaciju i koagulaciju. U krvi postoji niz topljivih enzima sustava koagulacije koji su u inaktivnom stanju, a koji se aktiviraju prilikom ozljede, a njihova kaskadna aktivacija i djelovanje rezultira stvaranjem netopljivog ugruška iz topljivih plazmatskih proteina. Prilikom tog procesa krvne pločice-trombociti igraju vrlo važnu ulogu.

Prva pojava koja se dogodi kod ozljede žile jest njen spazam, nakon čega se stvara trombocitni čep. Sam je spazam uzrokovan živčanim refleksom. Kontrakciju manjih krvnih žila uzrokuje tvar tromboksan A2 kojeg luče trombociti na mjestu ozljede. Intenzitet spazma krvne žile korelira s jačinom njene ozlijede.

Za stvaranje trombocitnog čepa zaslužni su trombociti koji tijekom toga procesa bitno promijene svoja svojstva. Trombociti ili krvne pločice nastaju u koštanoj srži fragmentiranjem zrelih megakariocita. Oni jesu stanice bez jezgre, međutim trombociti i dalje imaju značajan metabolički aparat u obliku mitohondrija s enzimatskim sustavom koji stvara ATP i ADP. Također posjeduju ostatke endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog tijela koji služe kao mjesto sinteze nekih enzima te kao znatan rezervoar iona kalcija. Trombociti također metaboliziraju arahidonsku kiselinu oslobođenu fosfolipazom i stvaraju razne produkte od kojih je vrlo važan tromboksan A2. Oni također imaju veliku sposobnost mijenjanja oblika, za što su zaslužne molekule aktina, miozina te trombostenina. Također stvaraju faktor stabilizacije fibrina koji je važan za učvršćivanje ugruška. Na samoj se membrani trombocita nalaze razni glikoproteini koji sprječavaju adheziju trombocita na zdrav endotel, a omogućavaju adheziju na oštećeni endotel te još više na kolagen koji se nalazi u dubljim dijelovima žila. Membranski glikoprotein IIb/IIIa omogućuje vezanje trombocita za fibrinske niti koje nastaju tijekom koagulacijske kaskade, ali tek nakon aktivacije trombocita ADP-om.

U membrani se još može naći i fosfolipide koji aktiviraju koagulacijsku kaskadu na više načina (Gale, 2011; Guyton i Hall, 2011; Tanaka i sur., 2009).

Kada se pojavi oštećenje na krvnim žilama trombociti se smjesta vežu za bjelančevinu zvanu von Willebrandov faktor ili na kolagen koji su nakon oštećenja dostupni trombocitima, a što je prikazano na slici 2. Trombociti nabubre, poprime nepravilne oblike te stezanjem počnu otpuštati brojne aktivne tvari kao što su ADP, tromboksan A2 i serotonin, a koje aktiviraju druge trombocite. Oštećeno mjesto luči faktore kemotaksije koji privlače mnogo trombocita koji također luče spomenute faktore s istom svrhom. Taj proces stvaranja rahlog trombocitnog čepa koji je prikazan na slici 2 uglavnom je dovoljan za začepljenje manjih ozljeda krvnih žila. Na prethodno spomenutoj slici je vidljivo i da se na trombocite vežu fibrinske niti nastale od fibrinskih monomera, a koji nastaju tijekom procesa koagulacije iz plazmatske bjelančevine fibrinogena.



Slika 2: Prikaz stvaranja trombocitnog čepa. Oštećenjem endotela kapilara inače nedostupni kolagen i von Willebrandov faktor postaju dostupni trombocitima koji se na njih vežu pomoću svojih glikoproteina. Oni također omogućavaju i vezanje fibrinskih vlakana za površinu trombocita te međusobno vezanje trombocita.

Proces koagulacijske kaskade je vrlo složen, a pojednostavljeno se može reći da napreduje ovako: tvari koje se oslobađaju prilikom ozlijede žile ili krvi aktiviraju niz faktora koji su u inaktivnom obliku prisutni u krvi te se naposljetku stvara kompleks aktivator protrombina za čiju je daljnju funkciju nužna dovoljna količina iona kalcija u krvi.

Protrombin je enzim koji je također prirodno prisutan u krvi te se on, kao i većina koagulacijskih faktora, stvara u jetri, a za njihovu sintezu nužan je vitamin K. Jednom aktiviran spomenutim kompleksom aktivatorom protrombina, protrombin prelazi u aktivni enzim trombin koji onda cijepa krvnu bjelančevinu fibrinogen u topljive fibrinske monomere. Fibrinogen također nastaje u jetri. Potom se monomeri fibrina u prisustvu iona kalcija polimeriziraju u dugačke netopljive niti. Te niti isprva nisu čvrsto povezane, no trombociti koji se hvataju u takvu fibrinsku mrežu luče faktor stabilizacije fibrina koji je u malim količinama normalno prisutan u krvi u inaktivnom stanju, a aktivira se trombinom. Tako aktiviran faktor stabilizacije fibrina katalizira kovalentno povezivanje rahlih fibrinskih niti u čvrstu strukturu koja se proteže kroz žilu i veže se za njene stijenke. Kako se proces koagulacije ne bi proširio po cijelom krvožilnom sustavu, mnogo se protrombina veže za same trombocite koji su vezani za oštećeno mjesto na žili.

Tako se stvoren ugrušak sastavljen od fibrinskih niti, krvnih stanica i trombocita steže. Svrha stezanja je približavanje rubova ozljede i smanjenje krvarenja. Unutarstanične bjelančevine trombocita aktin, miozin te trombostenin imaju vrlo važnu ulogu kod stezanja jer upravo one omogućuju kontrakciju trombocitnih izdanaka. Kontrakciju kataliziraju trombin te kalcijevi ioni koji se otpuštaju iz endoplazmatskog retikuluma, mitohondrija i Golgijevog tijela trombocita.

Može se reći da u procesu nastanka ugruška djeluje pozitivna povratna sprega. Jednom kada se stvori kritična količina trombina on svojim katalitičkim djelovanjem na više mjesta u koagulacijskoj kaskadi ubrzava cijeli proces sve do saniranja ozlijede. Nakon nekoliko dana od nastanka ugruška okolna tkiva počinju otpuštati snažan aktivator koji je nazvan tkivni aktivator plazminogena. Plazminogen je enzim u inaktivnom obliku kojeg spomenuti faktor aktivira, a njegova je zadaća cijepanje fibrinskih niti na topljive monomere. Na taj način se otapa ugrušak te se omogućuje ponovni protok krvi kroz male žile koje bi se u suprotnom sve brzo začepile ugruščima koji svakodnevno nastaju zbog malih puknuća žila (Guyton i Hall, 2011).

1.5. ANTIAGREGACIJSKA TERAPIJA

Opisani procesi zaustavljanja krvarenja su od životne važnosti, no sa starenjem svi sustavi organizma pa tako i sustav hemostaze zakazuju. Kod dijela ljudi uslijed nepravilne prehrane i manjka tjelesne aktivnosti javljaju se bolesti i poremećaji kao što su dijabetes, hipertenzija ili dislipidemija koje ubrzavaju napredovanje arterioskleroze. Arterioskleroza je upalni proces koji zahvaća arterije. Njezin intenzitet ovisi o mnogo faktora, kao što su gensko naslijeđe, tjelesna aktivnost ili prehrana. Posljedica njenog napretka je stvaranje aterosklerotskog plaka koji narušava površinu endotela. Plak može puknuti i tako pokrenuti agregaciju trombocita, koagulacijsku kaskadu i stvaranje tromba, što za posljedicu ima prekid opskrbe krvlju određenih organa i posljedično njihovo odumiranje, što može biti smrtonosno. Nastanku tromba pogoduju poremećen tok krvi, korištenje oralnih kontraceptiva, bakterijska infekcija, fibrilacija atrija, nestabilna angina pektoris te umjetni zalisci. Uslijed nezdravih životnih navika ljudi u razvijenom svijetu kardiovaskularni poremećaji, pa tako i tromboza, jedan su od vodećih uzroka smrtnosti te je stoga uloženo mnogo truda u otkrivanje lijekova koji bi spriječili agregaciju trombocita i koagulaciju krvi (Guyton i Hall, 2011; Tanaka i sur., 2009).

Antikoagulacijska terapija djeluje na jedan ili više faktora koagulacijske kaskade, a antiagregacijska terapija djeluje inhibiranjem funkcije trombocita te se sprječavanjem njihove agregacije sprječava nastajanje tromba. Postoji nekoliko lijekova koji djeluju na agregaciju trombocita na razne načine. Najkorišteniji je lijek acetilsalicilna kiselina koja djeluje inhibicijom funkcije enzima ciklooksigenaze i stvaranja eikosanoida s protrombotičkim djelovanjem. Klopidogrel i tiklodipin djeluju kao antagonisti ADP receptora P2Y12 koji se nalaze na membranama trombocita. Abciksimab, tirofiban i eptifibatid su antagonisti glikoproteina IIb/IIIa na membranama trombocita i tako inhibiraju njihovu agregaciju. U kombinaciji s drugim lijekovima koriste se još dipiridamol i cilastazol.

Acetilsalicilna kiselina jedan je od najstarijih lijekova koji se još uvijek koriste. Djeluje ireverzibilnom acetilacijom enzima ciklooksigenaze 1 i 2 u trombocitima i u endotelu krvnih žila. Acetilsalicilna kiselina se natječe s arahidonskom kiselinom za aktivno mjesto na enzimu te jednom kad dođe do aktivnog mjesta ireverzibilno acetilira serinske ostatke pa enzim nepovratno gubi funkciju, a trombocit sposobnost sinteze protrombotičkih eikosanoida iz arahidonske kiseline. Kako je eikosanoid tromboksan A2 zaslužan za promjene oblika

trombocita, pražnjenje njihovih granula i agregaciju, inhibicijom njegovog nastanka ometeno je stvaranje tromba.

Drugi lijekovi s ireverzibilnim djelovanjem su tiklopidin i klopidogrel. Djeluju kao antagonisti ADP receptora P2Y12. Posljedično izostaje promjena konformacije glikoproteina IIb/IIIa pa ne dolazi do vezanja fibrinskih niti za trombocite. Ovi lijekovi imaju mnogo nuspojava, kao što su mučnina, proljev, dispepsija, krvarenja te vrlo rijetko leukopenija. Klopidogrel nešto rjeđe uzrokuje navedene nuspojave, ima bolji sigurnosni profil i jednostavnije se dozira te se stoga upravo on i preferira kao antiagregacijski lijek kod ljudi koji ne podnose acetilsalicilnu kiselinu. Trombotička trombocitopenička purpura jedna je od rijetkih, ali teških nuspojava klopidogrela.

Antitrombotski se učinak također može postići djelovanjem na receptor glikoprotein IIb/IIIa koji je receptor za fibrinogen, vitronektin, fibronektin i von Willebrandov faktor. Lijekovi s ovim djelovanjem primjenjuju se parenteralno. Abciksimab je kimerno monoklonsko protutijelo koje se veže za glikoprotein IIb/IIIa. Eptifibatid je sličan krajnjoj karboksi-terminalnoj sekvenci delta lanca fibrinogena te inhibira njegovo vezanje za glikoprotein IIb/IIIa. Tirofiban djeluje slično eptifibatidu i oni svojim vezanjem inhibiraju vezanje drugih liganada za glikoprotein IIb/IIIa.

Dipiridamol inhibira unos adenozina u trombocite te inhibira fosfodiesterazu koja razgrađuje cAMP. Djeluje kao blagi vazodilatator. Primjenjuje se u kombinaciji s acetilsalicilnom kiselinom jer sam po sebi nema utjecaja na agregaciju trombocita. Cilastazol je također inhibitor fosfodiesteraze i vazodilatator, ali za razliku od dipiridamola on ima antiagregacijsko djelovanje (Katzung i sur., 2011).

Navedeni lijekovi imaju neugodne nuspojave, teže se podnose te mogu stupati u interakcije s drugim lijekovima. Potraga za novim antiagregacijskim lijekovima i dalje traje. Antiagregacijski utjecaj flavonoida poznat je dulje vrijeme te se nastoji otkriti koja molekula ili kombinacija molekula i u kojoj koncentraciji imaju najpovoljniji učinak na inhibiciju agregacije trombocita. S obzirom na to da flavonoidi nemaju zamjetnih nuspojava u višim koncentracijama i pri dugotrajnom izlaganju, bilo bi idealno kada bi jedan od njih pokazivao značajno djelovanje na inhibiciju agregacije trombocita u čovjeku.

1.6. TESTOVI AGREGACIJE TROMBOCITA

Ispitivanja trombocita provode se u svrhu određivanja morfoloških svojstava trombocita, a to su broj trombocita i njihov izgled. Također se mjeri i njihova funkcija i to određivanjem agregacije trombocita, vremena krvarenja i drugih parametara funkcije trombocita. Ispitivanje se može provoditi u punoj krvi ili u plazmi bogatoj trombocitima. Neke od poznatih tehnika su protočna citometrija, analiza funkcije trombocita, ELISA, trombocitna impedancijska agregometrija i dr. (Paniccia i sur., 2015).

U uzorak krvi pacijenta koji sedam dana nije uzimao lijekove koji bi utjecali na agregaciju trombocita stavlja se natrijev citrat kao antikoagulans. Takav uzorak se čuva na sobnoj temperaturi ili pri 37°C. Ovisno o korištenoj metodi, krv se može odmah podvrgnuti mjerenjima ili ju se podvrgne centrifugiranju kako bi se dobila plazma bogata trombocitima. Metoda mjerenja koja koristi punu krv jest impedancijska trombocitna agregometrija, a metoda u kojoj mjerenje provodi u plazmi bogatoj trombocitima jest turbidimetrijsko određivanje agregacije trombocita. Kako plazma bogata trombocitima nije prirodna okolina za agregaciju trombocita i kako se u toj metodi koristi samo jedan induktor agregacije, ova metoda ne omogućava potpun uvid u funkciju trombocita. Metoda je i dugotrajna, a rezultati variraju od laboratorija do laboratorija pa se u ovom radu koristila metoda impedancijske trombocitne agregometrije.

Impedancijska trombocitna agregometrija se temelji na pojavi čvrstog prianjanja aktiviranih trombocita za elektrode, čime se povećava impedancija. Mjerenje se provodi u 0,3 ml pune krvi. Kako trombociti sami po sebi ne agregiraju, mora ih se potaknuti na to jednim od induktora agregacije,a u ovom je radu kao induktor agregacije odabran ADP. Impedancija se bilježi tijekom vremena, čime se dobiva podatak o funkciji trombocita. Kako bi se spriječila koagulacija uzoraka krvi u njih se kao antikoagulans dodaje natrijev citrat koji kompleksira kalcijeve ione prisutne u krvi (Yardumian i sur., 1986; www.cobas.com). Kalcijevi ioni su vrlo važni u agregaciji trombocita. Stoga je prije samog mjerenja u uzorke krvi tretirane natrijevim citratom potrebno dodati otopinu kalcijeva klorida u fiziološkoj otopini kako bi se dobili točni rezultati (Calatzis i sur. 2007; Wallén i sur., 1997).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Kardiovaskularne bolesti su jedan od najvećih tereta za zdravstveni sustav. Sve je veći broj bolesnika s poremećajima krvožilnog sustava koji variraju od jednostavne hipertenzije pa sve do moždanog i srčanog udara. Povećavanjem udjela stare populacije u ukupnome stanovništvu taj problem postaje sve izraženiji. Kako poremećaji grušanja krvi za posljedicu često imaju smrtne ishode, od farmacije se očekuje razvitak pouzdanih i sigurnih lijekova. U sprječavanju tromboze već se dugo koristi acetilsalicilna kiselina koja nije bez nuspojava te je u nekim slučajevima kontraindicirana, primjerice u trudnoći i laktaciji. Klopidogrel nešto rjeđe izaziva nuspojave, ali su te nuspojave, kao što su krvarenja i trombotička trombocitopenička purpura, mnogo ozbiljnije. Tehnologija rekombinantne DNA je omogućila korištenje monoklonskih protutijela (abciksimab) i proteina (tirofiban), ali ti lijekovi nisu pogodni za svakodnevnu terapiju jer se moraju primijeniti parenteralno.

Ispitivanja su pokazala da polifenolni spojevi, a posebice flavonoidi, imaju blagotvoran utjecaj na kardiovaskularno zdravlje. Jedan od njihovih učinaka jest i inhibicija agregacije trombocita, a mehanizam koje nije još u potpunosti proučen. Jedan od polifenolnih spojeva s potvrđenim antiagregacijskim djelovanjem je ružmarinska kiselina. Ona se nalazi u velikom broju biljaka pa tako i u matičnjaku. Ako bi se utvrdilo da neki sastojak ekstrakta matičnjaka uspijeva značajno inhibirati agregaciju trombocita to bi možda dovelo do otkrića spojeva koji bi se mogli iskoristiti za razvitak novih antiagregacijskih lijekova. Razlog zbog kojeg se želi pronaći sigurne i učinkovite antiagregacijske, a ne antikoagulacijske lijekove je taj da antiagregacijski lijekovi imaju “ciljanije” djelovanje na trombocite za razliku od antikoagulacijskih lijekova koji utječu na cijelu koagulacijsku kaskadu pa stoga uzrokuju i više nuspojava.

Svrha je ovog rada utvrditi postoje li u ekstraktu lista matičnjaka takvi spojevi s antiagregacijskim djelovanjem. Metoda kojom će se pratiti utjecaj ekstrakta lista matičnjaka na agregaciju trombocita je impedancijska trombocitna agregometrija. Kako bi se osiguralo da uvjeti u kojima se ispituje utjecaj tvari budu što prirodniji, za ispitivanje inhibicije agregacije koristiti će se uzorci pune krvi, a također će se paziti da pacijenti sedam dana prije davanja krvi nisu uzimali nikakve lijekove koji bi mogli utjecati na agregaciju trombocita. Ova metoda ne zahtjeva obradu uzorka krvi što osigurava da integritet trombocita ostane nenarušen. Za indukciju agregacije koristit će se ADP. Izmjereni rezultati usporediti će se s rezultatima mjerenja utjecaja standarda ružmarinske kiseline na agregaciju trombocita kao glavne sastavnice ekstrakta matičnjaka.

3. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u sklopu doktorske disertacije Andree Antolić, univ. mag. pharm. i Ivane Babić, mag. med. biochem.. U ovom istraživanju sudjelovalo je ukupno 10 dobrovoljaca. Svi dobrovoljci su potpisali informirani pristanak.

3.1.1. UZORCI

Puna krv dobrovoljaca kojoj je kao antikoagulacijsko sredstvo dodan natrijev citrat. Dobrovoljci nisu uzimali lijekove koji bi utjecali na agregaciju trombocita najmanje sedam dana prije davanja uzorka krvi. U radu su korišteni sljedeći uzorci etanolnih ekstrakata matičnjaka koji su pripravljeni prema propisu Europske farmakopeje za određivanje sadržaja fenolnih kiselina u matičnjaku:

- Uzorak 1a, te uzorci dobiveni njegovim razrjeđenjem 10 i 100 puta
- Uzorak 1b, te uzorci dobiveni njegovim razrjeđenjem 10 i 100 puta
- Uzorak 2, te uzorci dobiveni njegovim razrjeđenjem 10 i 100 puta
- Uzorak 3, te uzorci dobiveni njegovim razrjeđenjem 10 i 100 puta
- Uzorak 4, te uzorci dobiveni njegovim razrjeđenjem 10 i 100 puta

Uzorci matičnjaka 1a i 1b dobiveni su iz Farmaceutskog botaničkog vrta „Fran Kušan" Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a preostali uzorci matičnjaka pribavljeni su komercijalno od tvrtke Suban d.o.o. (Strmec, Hrvatska).

3.1.2. STANDARDI

U radu su korištene otopine standarda ružmarinske kiseline (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) u dimetilsulfoksidu (DMSO) sljedećih koncentracija:

1. 1 mg/mL
2. 0,1 mg/mL
3. 0,01 mg/mL
4. 0,001 mg/mL

3.1.3. KEMIKALIJE

U radu su korištene sljedeće kemikalije i otopine:

- dimetilsulfoksid (DMSO), Sigma-Aldrich, Švicarska
- fiziološka otopina s dodatkom kalcijeva klorida (0,003 M $CaCl_2$ u 0,9% NaCl), Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska
- adenozin-difosfat (ADP), Roche, Švicarska

3.1.4. INSTRUMENTI I LABORATORIJSKI PRIBOR

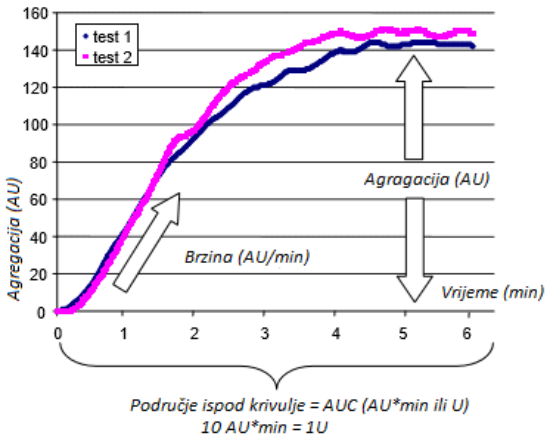
Ispitivanje je provedeno na višestrukom analizatoru funkcije trombocita Multiplate® (Roche, Švicarska) koji je prikazan na slici 3. Uređaj ima pet kanala za istovremeno testiranje. Računalni program navodi korisnika na pravilno korištenje automatske pipete kako bi se maksimalno pojednostavio čitav postupak. Na slici 3 prikazana je i kiveta za mjerenje s dva para srebrnih elektroda i s teflonom prevučenim magnetskim mješačem. Parovi elektroda u kiveti neovisno mjere agregaciju trombocita. Rezultati dobiveni mjerenjima istoga uzorka bi se smjeli razlikovati najviše 20%. Kivete su izravno povezane s računalom koje putem elektroda provodi mjerenje i istovremeno bilježi podatke. Eksperimentalni dio rada proveden je na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu.



Slika 3: Multiplate® agregometar i kiveta s dva para srebrnih elektroda s magnetskim mješačem obloženim teflonom.

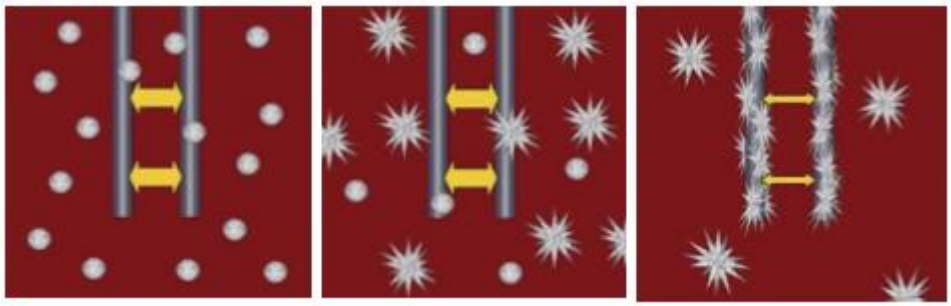
3.1.5. METODE

Mjerenje agregacije trombocita temelji se na mjerenju otpora izmjeničnoj struji (impedanciji) između dvije elektrode. Jednom potaknuti na agregaciju, trombociti se priljepljuju za elektrode u kiveti te povećavaju impedanciju, što se prati na računalu kao povećanje impedancije u ovisnosti o vremenu. To je prikazano kao graf ovisnosti agregacije (izraženo u arbitrarnim jedinicama, AU) o vremenu. Takav graf prikazan je na slici 4. Izračuna se površina ispod krivulje (AUC), koja se koristi u daljnjoj podatkovnoj analizi.



Slika 4: Graf ovisnosti agregacije o vremenu dobiven mjerenjem. U daljnjoj analizi se koristi vrijednost AUC – površina ispod krivulje.

Prednost ove metode je njena brzina i jednostavnost. Mjerenje je znatno ubrzano samim time što se ono provodi na uzorku pune krvi, a ne na plazmi bogatoj trombocitima za čije bi se dobivanje utrošilo mnogo vremena centrifugirajući uzorke pune krvi. Mjerenje u punoj krvi također znači da trombociti nisu oštećeni te signalne tvari sadržane u njima nisu izlivene u krv, što bi moglo uzrokovati promjene u agregaciji. Na slici 5 prikazana je progresija aktivacije i agregacije trombocita. Vidljivo je da trombociti u svom normalnom stanju ne agregiraju, nego tek pod djelovanjem raznih signalnih molekula mijenjaju svoj oblik te na svojim membranama prezentiraju adhezijske molekule pomoću kojih prijanjaju i međusobno i za površinu elektroda. Jednom aktivirani signalom za agregaciju oni će se čvrsto prilijepiti za stjenku elektroda. U ovoj je metodi induktor agregacije ADP. Za sprječavanje koagulacije krvi prije samog ispitivanja korišten je natrijev citrat koji kompleksira kalcijeve ione koji su važni u agregaciji na više mjesta. Uzorci krvi zdravih dobrovoljaca u kojima je korišten natrijev citrat kao antikoagulans zbog toga ne pokazuju očekivanu razinu agregacije pa da bi se omogućila normalna agregacija u uzorak krvi je potrebno dodati otopinu kalcijevog klorida. Metoda ne zahtijeva velik volumen uzoraka krvi (0,3 mL).



Slika 5: Agregacija trombocita na paru elektroda inducirana dodatkom ADP-a

3.1.6. PROVEDBA TESTA AGREGACIJE TROMBOCITA

Rabljen je postupak ASPI-ASA testa jer on omogućava dodatni korak u pripremi uzorka. Svi se sastojci dodaju u kivetu automatskom pipetom i to po unaprijed napisanome programu kroz kojeg korisnika vodi računalo. Svi uzorci pune krvi korišteni u ovim mjerenjima su prethodno bili podvrgnuti testovima agregacije kako bi se omogućio njihov probir na temelju AUC vrijednosti.

U kivetu u kojoj se provodi ispitivanje utjecaja ekstrakta matičnjaka na agregaciju trombocita doda se 300 µL fiziološke otopine s $CaCl_2$. Potom se doda 20 µL određenog ekstrakta matičnjaka te 300 µL krvi. Uzorak se inkubira 6 minuta na 36,8°C, nakon čega se dodaje 20 µL ADP-a koji je induktor agregacije. Nakon toga se uzorak inkubira 6 minuta prilikom kojih se provodi mjerenje. U kivetu u kojoj se provodi ispitivanje utjecaja standarda ružmarinske kiseline na agregaciju trombocita se umjesto 20 µL ekstrakta matičnjaka dodaje isti toliki volumen standarda ružmarinske kiseline određene koncentracije. Kako je moguće provoditi pet mjerenja agregacije istodobno, mjeri se agregacija u: jednoj negativnoj kontroli (ovdje se umjesto ekstrakta matičnjaka dodaje isti volumen DMSO-a), tri uzorka krvi svaki s razrijeđenim uzorkom ekstrakta matičnjaka poznate koncentracije te naposljetku u uzorku krvi sa otopinom standarda ružmarinske kiseline poznate koncentracije. U jednoj grupi od pet mjerenja koristi se uzorak krvi istog pacijenta. Ispitivanja učinka svih ekstrakata matičnjaka svih koncentracija i učinka otopine standarda ružmarinske kiseline provode se u duplikatu.

4. REZULTATI

U nastavku se nalaze rezultati mjerenja antiagregacijskog učinka analiziranih ekstrakata lista matičnjaka i ružmarinske kiseline kao najzastupljenije sastavnice te su prikazani na:

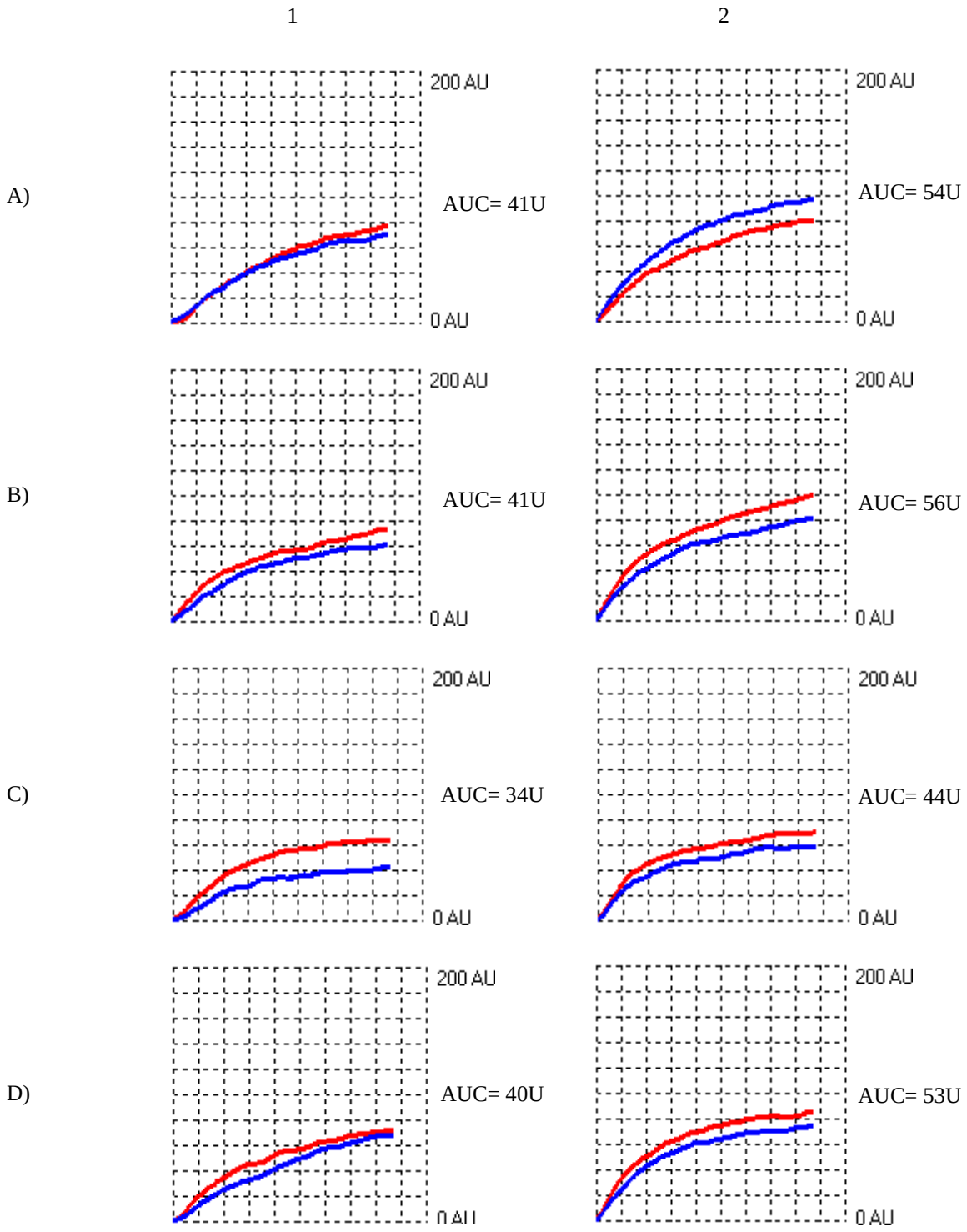
- **slici 6** koja prikazuje rezultate mjerenja antiagregacijskog učinka etanolnog ekstrakta matičnjaka 1a te njegovih razrjeđenja (10 i 100 puta),
- **slici 7** koja prikazuje rezultate mjerenja antiagregacijskog učinka etanolnog ekstrakta matičnjaka 1b te njegovih razrjeđenja (10 i 100 puta),
- **slici 8** koja prikazuje rezultate mjerenja antiagregacijskog učinka etanolnog ekstrakta matičnjaka 2 te njegovih razrjeđenja (10 i 100 puta),
- **slici 9** koja prikazuje rezultate mjerenja antiagregacijskog učinka etanolnog ekstrakta matičnjaka 3 te njegovih razrjeđenja (10 i 100 puta),
- **slici 10** koja prikazuje rezultate mjerenja antiagregacijskog učinka etanolnog ekstrakta matičnjaka 4 te njegovih razrjeđenja (10 i 100 puta) i na
- **slici 11** koja prikazuje rezultate mjerenja antiagregacijskog učinka otopine standarda ružmarinske kiseline i njezinih razrjeđenja (10, 100 i 1000 puta).

Prilikom izvođenja mjerenja antiagregacijskog učinka svakog uzorka izvođeno je i kontrolno mjerenje agregacije (negativna kontrola) gdje je umjesto određenog volumena ekstrakta matičnjaka u kivetu za mjerenje dodan isti volumen dimetilsulfoksida (DMSO). U uzorak se ne dodaje etanol jer on sam po sebi ima antiagregacijsko djelovanje pa bi se dobio lažno pozitivan rezultat. Rezultati mjerenja agregacije kontrolnih uzoraka prikazani su na slikama 6-10.

Na svim je slikama vidljiv graf ovisnosti agregacije trombocita o vremenu. Na apscisi je izraženo vrijeme, a na ordinati agregacija trombocita izražena u arbitrarnim jedinicama. Za svaku krivulju izračunata je površina ispod krivulje (AUC, eng. *area under curve*) koja je navedena kraj svakog grafa.

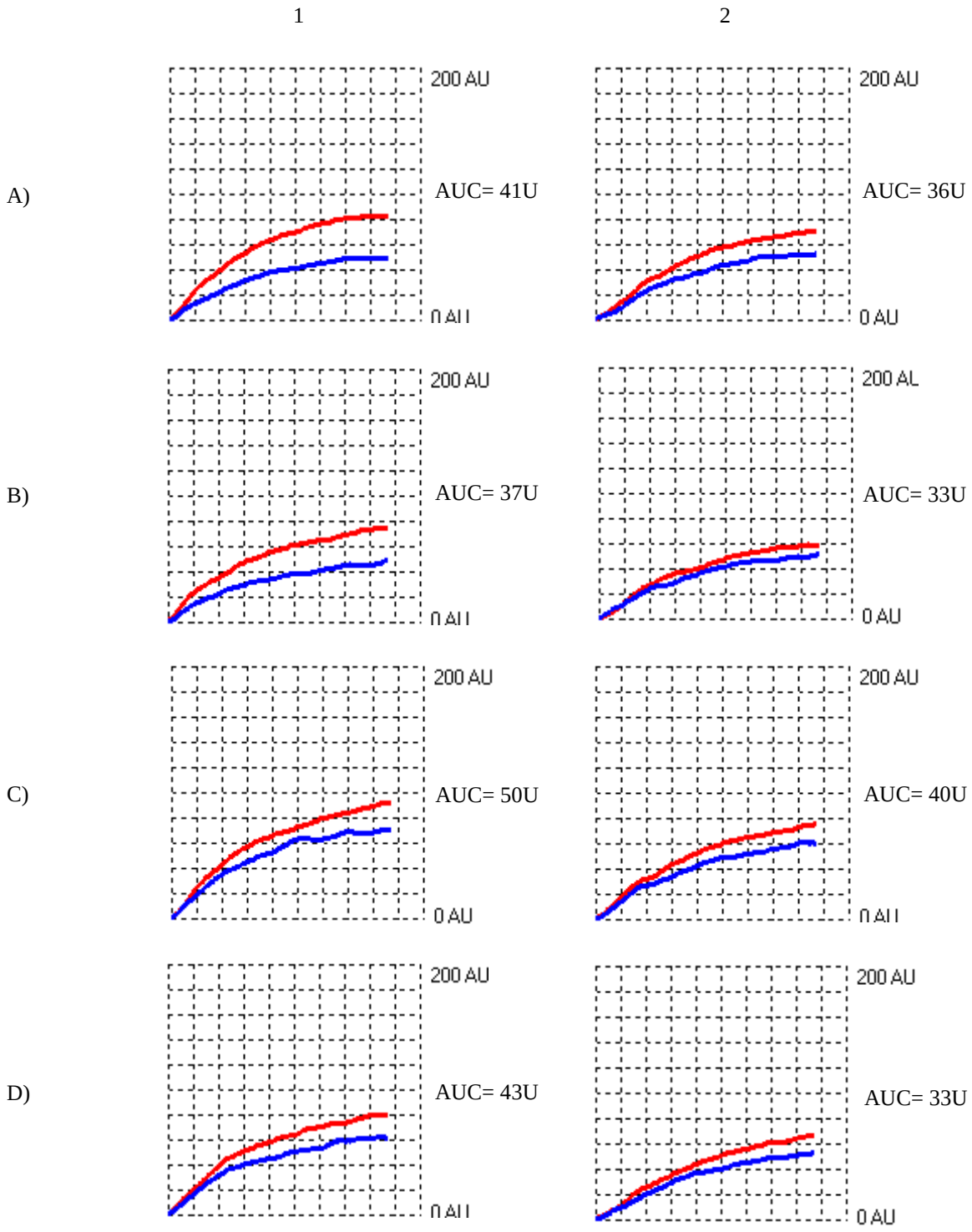
Mjerenje antiagregacijskog učinka svakog ekstrakta provedeno je u duplikatu, što je prikazano u dva stupca: 1 i 2.

MJERENJE



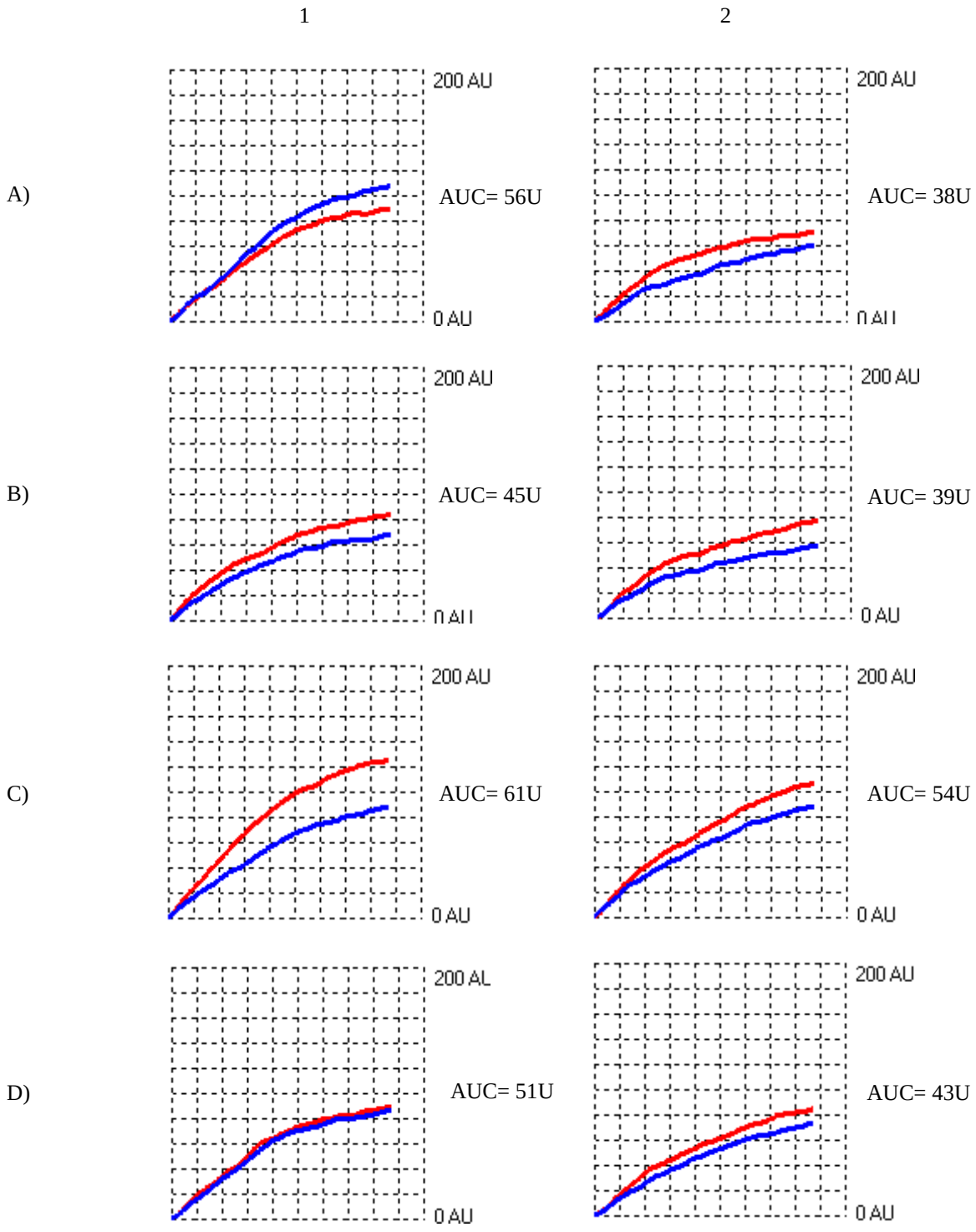
Slika 6: Rezultati mjerenja za ekstrakt 1a: a) negativna kontrola, b) nerazrijeđen ekstrakt, c) 10 puta razrijeđen ekstrakt, d) 100 puta razrijeđen ekstrakt matičnjaka. Mjerenje uzorka 1a je izvedeno u duplikatu i rezultati su prikazani odvojeno kao stupac 1 i 2.

MJERENJE



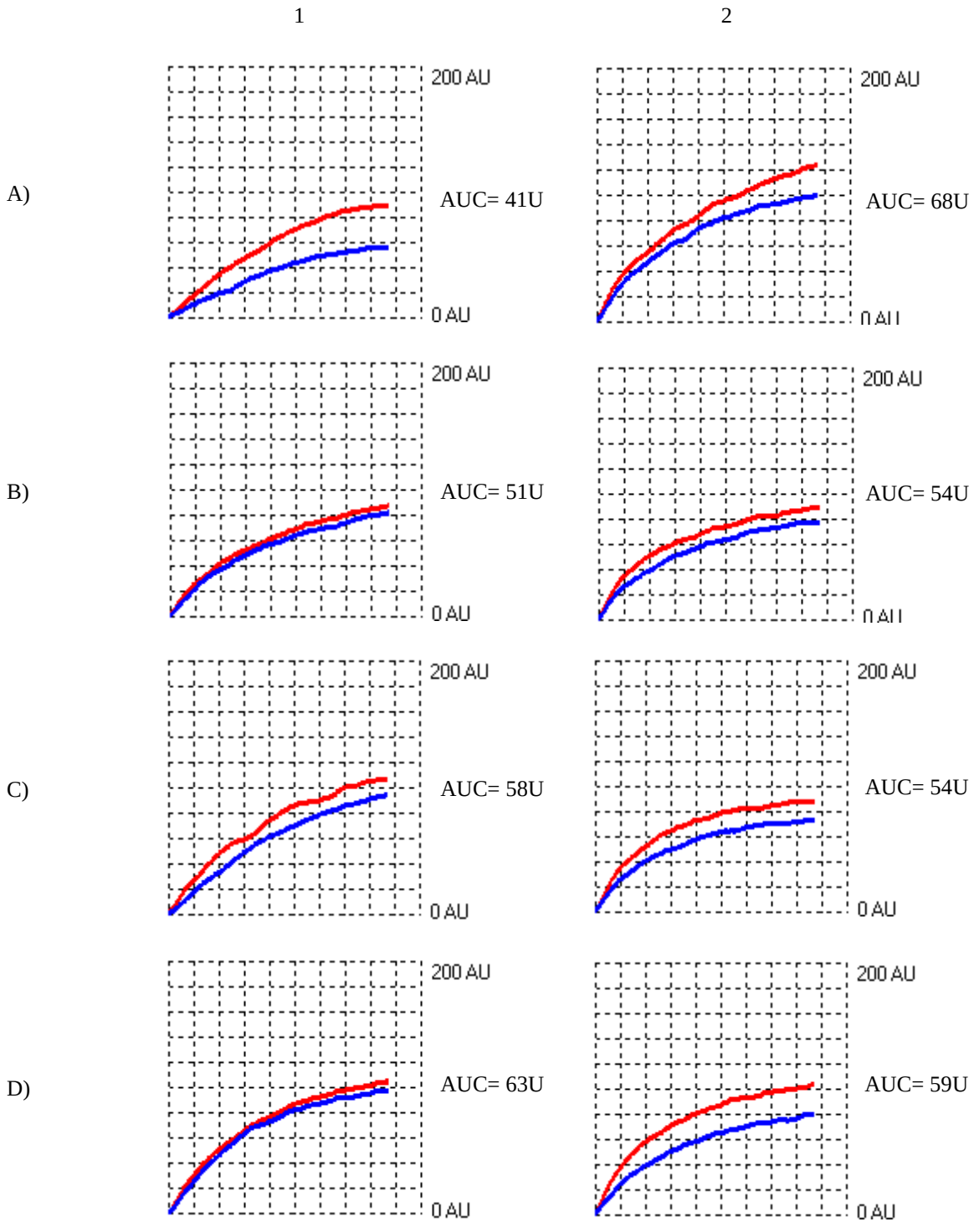
Slika 7: Rezultati mjerenja za ekstrakt 1b: a) negativna kontrola, b) nerazrijeđen ekstrakt, c) 10 puta razrijeđen ekstrakt, d) 100 puta razrijeđen ekstrakt matičnjaka. Mjerenje uzorka 1b je izvedeno u duplikatu i rezultati su prikazani odvojeno kao stupac 1 i 2.

MJERENJE



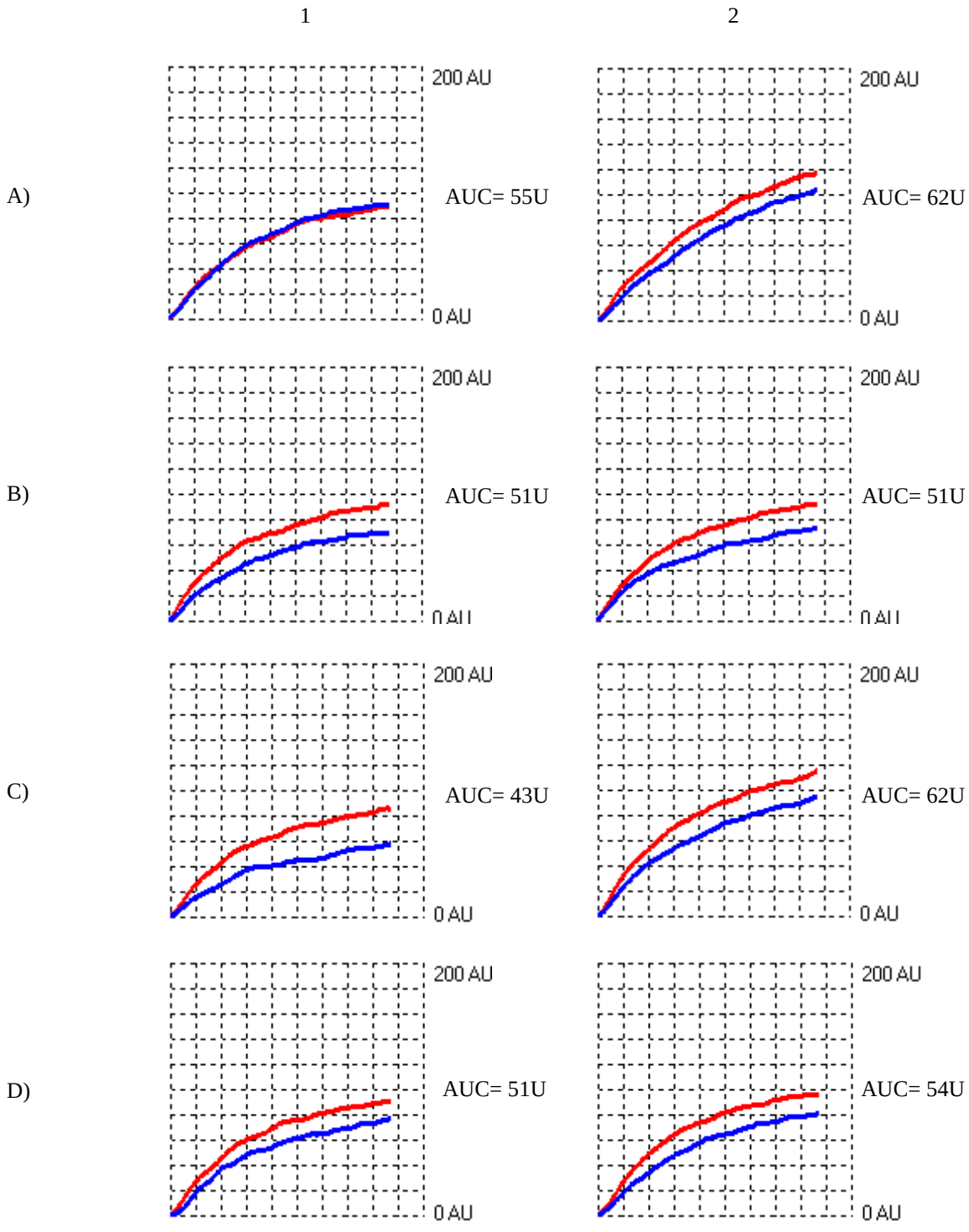
Slika 8: Rezultati mjerenja za ekstrakt 2: a) negativna kontrola, b) nerazrijeđen ekstrakt, c) 10 puta razrijeđen ekstrakt, d) 100 puta razrijeđen ekstrakt matičnjaka. Mjerenje uzorka 2 je izvedeno u duplikatu i rezultati su prikazani odvojeno kao stupac 1 i 2.

MJERENJE

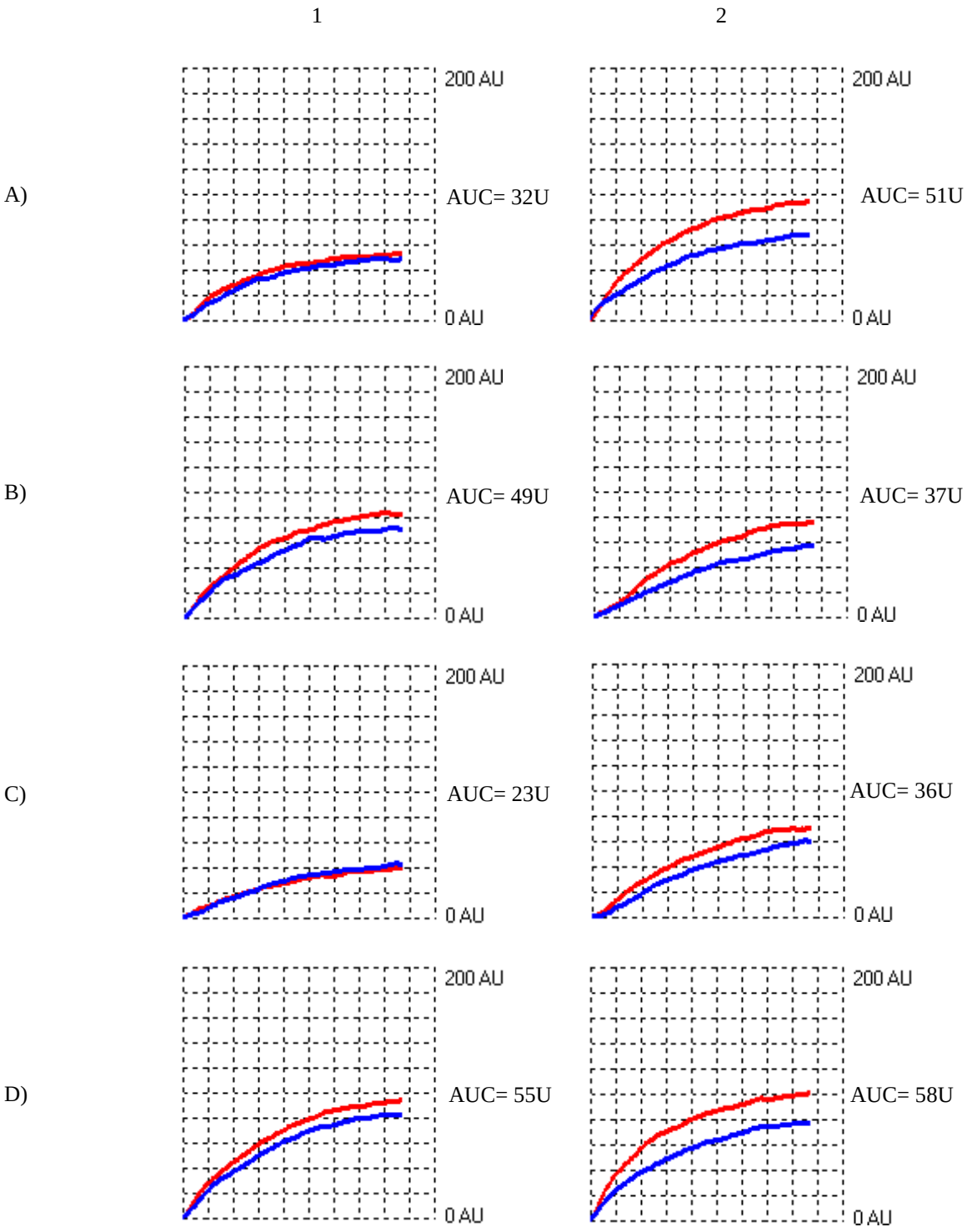


Slika 9: Rezultati mjerenja za ekstrakt 3: a) negativna kontrola, b) nerazrijeđen ekstrakt, c) 10 puta razrijeđen ekstrakt, d) 100 puta razrijeđen ekstrakt matičnjaka. Mjerenje uzorka 3 je izvedeno u duplikatu i rezultati su prikazani odvojeno kao stupac 1 i 2.

MJERENJE



Slika 10: Rezultati mjerenja za ekstrakt 4: a) negativna kontrola, b) nerazrijeđen ekstrakt, c) 10 puta razrijeđen ekstrakt, d) 100 puta razrijeđen ekstrakt matičnjaka. Mjerenje uzorka 4 je izvedeno u duplikatu i rezultati su prikazani odvojeno kao stupac 1 i 2.

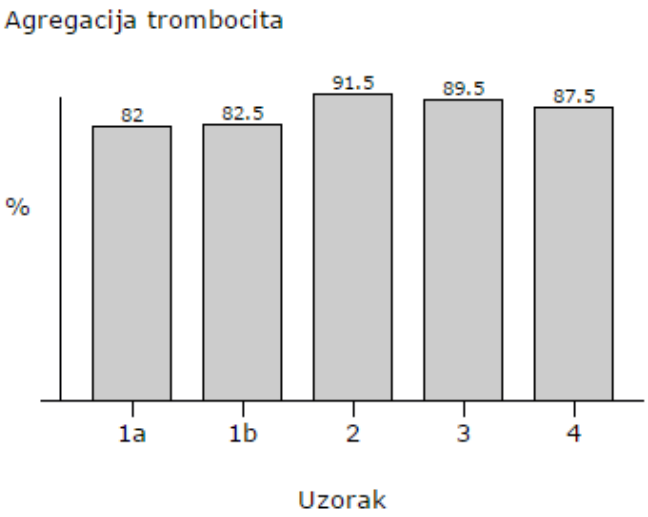


Slika 11: Rezultati mjerenja za otopinu standarda ružmarinske kiseline: a) koncentracije 1 mg/mL, b) koncentracije 0,1 mg/mL, c) koncentracije 0,01 mg/mL, d) koncentracije 0,001 mg/mL. Mjerenje je izvedeno u duplikatu i rezultati su prikazani odvojeno kao stupac 1 i 2.

5. RASPRAVA

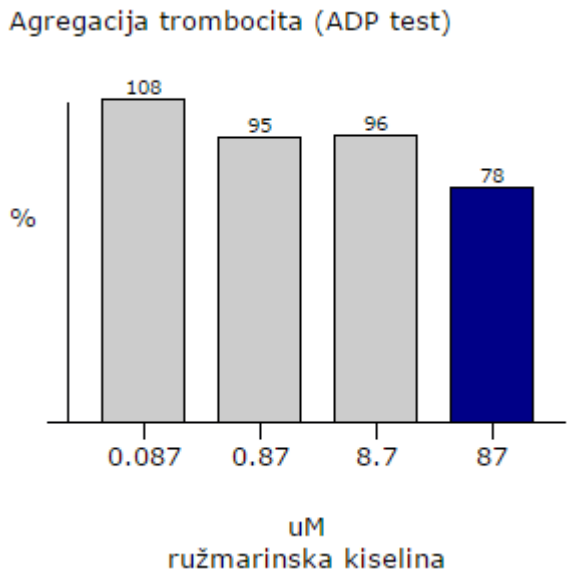
U ovom se radu ispitivao antiagregacijski učinak ekstrakta matičnjaka na većem broju uzoraka krvi metodom trombocitne impedancijske agregometrije. Ispitivanja su se provela na većem broju uzoraka kako bi se otklonio utjecaj biovarijabilnosti na rezultate istraživanja. Velika je pažnja pridodana tome da davatelji krvi nisu uzimali lijekove s djelovanjem na agregaciju trombocita najmanje sedam dana prije davanja uzorka kako i to ne bi imalo utjecaja na rezultate mjerenja. Ispitivanja su se provodila na uzorcima pune krvi kako bi se stvorio što prirodniji okoliš za agregaciju trombocita. Ipak treba reći da u krvnoj žili agregacija trombocita počinje nakon njihove interakcije s molekulama oslobođenim iz oštećenih stanica endotela ili dubljih dijelova žile pa stoga ova metoda ne oponaša u potpunosti prirodno okruženje u kojem trombociti agregiraju.

Mali volumen krvi koji nije potrebno obrađivati osigurao je relativnu brzinu i jednostavnost postupka. Mjerenje je provođeno u kivetama s dva para mjernih elektroda kako bi se osiguralo dobivanje pouzdanih rezultata. Za poticanje agregacije korišten je ADP. Valja reći da inicijaciju agregacije ne uzrokuje samo ADP, nego i niz drugih tvari koje otpuštaju trombociti, stanice endotela i stanice dubljih dijelova krvne žile. Nakon jednosmjerne ANOVA statističke analize s Tukeyovim *post hoc* testom primijećen je značajan antiagregacijski učinak ekstrakta lista matičnjaka. Na slici 12 prikazani su antiagregacijski učinci etanolnih ekstrakata matičnjaka. Omjerom površina ispod krivulja dobivenih mjerenjem agregacije u svakom uzorku u kojeg su dodani ekstrakti i površina ispod krivulje dobivene mjerenjem agregacije u uzorku krvi koji je služio kao negativna kontrola dobiveni su postotci dati iznad svakog stupca. Stoga je uzorak krvi u koji je dodan npr. ekstrakt 1a postigao samo 82% agregacije koja je izmjerena u uzorku krvi koji je služio kao negativna kontrola. Ovdje primijećen učinak ne može se jednostavno ekstrapolirati na čovjeka iz već spomenutih razlika između stvarne situacije u krvnoj žili i ovog *in vitro* ispitivanja. Dodatna razlika između ovog *in vitro* ispitivanja i stvarne situacije je i ta da svi sastojci etanolnog ekstrakta matičnjaka uneseni u tijelo bivaju podvrgnuti metabolizmu, a nastali metaboliti vrlo vjerojatno pokazuju drugačiji antiagregacijski učinak.



Slika 12: antiagregacijski učinak etanolnih ekstrakata lista matičnjaka. Rezultat je prikazan kao postotak tj. kao omjer površine ispod krivulje dobivene mjerenjem agregacije trombocita u uzorku krvi kojem je dodan ekstrakt matičnjaka i površine ispod krivulje dobivene mjerenjem agregacije trombocita u uzorku krvi kojem nije dodan ekstrakt matičnjaka, nego isti volumen DMSO (negativna kontrola).

Ekstrakt lista matičnjaka pripravljen je prema propisu Europske farmakopeje za određivanje sadržaja fenolnih kiselina u matičnjaku i to tako da je 0,2 g droge ekstrahirano s 200 mL etanola. Stoga je koncentracija ekstrakta 1 mg/mL. Od tog su ekstrakta također pripremljeni njegovi razrijeđeni pripravci te je ispitano antiagregacijsko djelovanje i razrijeđenih i nerazrijeđenog ekstrakta. Nakon mjerenja i statističke obrade rezultata pokazalo se da je samo nerazrijeđen ekstrakt pokazao statistički značajno antiagregacijsko djelovanje. Koncentracija ekstrakta koji je pokazao takvo djelovanje u ispitivanoj smjesi je iznosila 31,25 µg/mL. Također se promatrao i antiagregacijski učinak same ružmarinske kiseline koji je prikazan na slici 13. Postotak izražen nad svakim stupcem dobiven je stavljanjem u omjer površina ispod krivulja dobivenih mjerenjem antiagregacijskog učinka otopina standarda ružmarinske kiseline i površine ispod krivulje dobivene mjerenjem agregacije u uzorku koji je služio kao negativna kontrola. Na slici 13 je vidljivo da 87 µM ružmarinska kiselina ima značajan antiagregacijski učinak koji je sličan učinku otopine ekstrakta matičnjaka koncentracije 31,25 µg/mL.



Slika 13: antiagregacijski učinak otopine standarda ružmarinske kiseline. Rezultat je prikazan kao postotak tj. kao omjer površine ispod krivulje dobivene mjerenjem agregacije trombocita u uzorku krvi kojem je dodan standard ružmarinske kiseline i površine ispod krivulje dobivene mjerenjem agregacije trombocita uzorka krvi kojem nije dodan standard ružmarinske kiseline, nego isti volumen DMSO-a (negativna kontrola).

Ekstrakt lista matičnjaka sadrži ružmarinsku kiselinu, nešto eteričnog ulja i flavonoida za koje se zna da imaju antiagregacijsko djelovanje. U svome su znanstvenom radu 2012. godine Hsiu-Fang i suradnici dokazali da eterično ulje matičnjaka ima zamjetna antiagregacijska svojstva. Bojić i suradnici su 2011. godine u svome znanstvenome radu dokazali antiagregacijski učinak niza flavonoida od kojih su u ekstraktima lista matičnjaka prisutni apigenin i luteolin, a čije su prisustvo u matičnjaku dokazale Patora i Klimek u svom radu iz 2002. godine. U sličnome su radu Arceusz i suradnici 2015. godine dokazali i kvantificirali kemferol, kvercetin, rutin i miricetin, čije su antiagregacijsko djelovanje dokazali Bojić i suradnici 2011. godine. Pignatelli i suradnici su u svome radu iz 2000. godine pokazali da flavonoidi kvercetin i katehin imaju sinergističko djelovanje na inhibiciju agregacije trombocita potaknutu kolagenom, što je svakako važna činjenica jer to znači da se značajan antiagregacijski učinak može postići pri nižim plazmatskim koncentracijama čak i onih flavonoida koji pri niskim plazmatskim koncentracijama sami za sebe ne pokazuju antiagregacijsko djelovanje.

Kako nam nije poznat sastav ekstrakta upotrijebljenog u ispitivanju teško je reći koja je sastavnica najzaslužnija za primijećeno antiagregacijsko djelovanje, no zbog usporedivosti koncentracije ekstrakta i standarda ružmarinske kiseline za zaključiti je da je najznačajnija sastavnica ekstrakta (ružmarinska kiselina) odgovorna za antiagregacijski učinak. Od iznimne je važnosti uzeti u obzir i opsežan metabolizam sastavnica ekstrakta jer se u ovome *in vitro* ispitivanju promatrao utjecaj sastavnica ekstrakta, ali ne i njihovih metabolita na agregaciju trombocita. Moguće je da metaboliti sastavnica ekstrakta uopće ne pokazuju antiagregacijsko djelovanje, ali je moguće i da pokazuju jače antiagregacijsko djelovanje. Još je važno prisjetiti se da su Pignatelli i suradnici 2000. godine dokazali da flavonoidi mogu pokazati sinergističko djelovanje te je stoga moguće da bi sastavnice ekstrakta *in vivo* unatoč niskim koncentracijama u krvi ipak pokazale zamjetan antiagregacijski učinak.

Iz ovoga se može zaključiti da ekstrakt lista matičnjaka sadrži tvari koje imaju antiagregacijsko djelovanje, a koje bi se mogle primijeniti u prevenciji tromboembolijskih bolesti. Kako se flavonoidi i polifenolne kiseline unose u tijelo unutar većeg broja prehrambenih namirnica i u raznim količinama, bilo bi teško točno odrediti koliko bi se ekstrakta trebalo konzumirati kako bi se pouzdano spriječila agregacija trombocita. Stoga je malo vjerojatno da bi se konzumacijom samog ekstrakta matičnjaka mogli spriječiti tromboembolijski incidenti.

6. ZAKLJUČAK

U ovome je radu metodom trombocitne impedancijske agregometrije proučavan utjecaj etanolnog ekstrakta matičnjaka i pripravaka dobivenih njegovim razrjeđenjem na agregaciju trombocita. Mjerenja su provođena na Multiplate® uređaju koji omogućava istodobna mjerenja na pet uzoraka krvi. Uzorci su prikupljeni od većeg broja dobrovoljaca kako bi se otklonio utjecaj biovarijabilnosti. Za indukciju agregacije korišten je ADP. Kao standard u ovom ispitivanju korištena je ružmarinska kiselina koja ima dokazano antiagregacijsko djelovanje. Prilikom ispitivanja mjerio se porast impedancije u ovisnosti o vremenu koji daje podatak o agregaciji koja je izražena preko arbitrarnih jedinica – AU (engl. *arbitrary units*). Za daljnju se analizu koristio AUC (engl. *area under curve*) – površina ispod dobivene krivulje .

Dobiveni podatci obrađeni su jednosmjernom ANOVA statističkom analizom s Tukeyovim *post hoc* testom te su pokazali da jedino nerazrijeđeni ekstrakti (31,25 μg/mL) pokazuju antiagregacijski učinak. Otopina standarda ružmarinske kiseline pokazala je statistički značajno smanjenje agregacije trombocita pri koncentraciji od 87 μM.

Ovime je pokazano da u ekstraktu lista matičnjaka postoje jedan ili više spojeva koji bi mogli poslužiti kao predložak za nove antiagregacijske lijekove. Potrebno je provesti opsežna istraživanja na samim ljudima kako bi se utvrdio cjelokupan antiagregacijski učinak te koji su spojevi zaslužni za njega.

Kako broj ljudi oboljelih od kardiovaskularnih bolesti raste, tako rastu i troškovi liječenja koji se sada mjere u milijardama dolara. Porast udjela starog stanovništva i sjedilački način života pogoduju porastu broja kardiovaskularnih bolesnika. Tromboembolijski poremećaji su skupina kardiovaskularnih bolesti koji zahtijevaju dugotrajnu farmakoterapiju koja ima određene nuspojave. Spojevi koje sadrži ekstrakt matičnjaka mogli bi predstavljati sigurniju i povoljniju alternativu u liječenju tromboembolijskih poremećaja.

7. LITERATURA

Arceusz A, Wesolowski M. Flavonoids and Phenolic Acids in Methanolic Extracts, Infusions and Tinctures from Commercial Samples of Lemon Balm. *Nat Prod Commun*, 2015, 10, 977-981.

Babu PV, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J Nutr Biochem*, 2013, 24, 1777-1789.

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

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

Cassidy A, Rogers G, Peterson JJ, Dwyer JT, Lin H, Jacques PF. Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults. *Am J Clin Nutr,* 2015, 102, 172-181.

Chen XQ, Wang XB, Guan RF, et al. Blood anticoagulation and antiplatelet activity of green tea (-)-epigallocatechin (EGC) in mice. *Food Funct*, 2013, 4, 1521-1525.

Chung MJ, Cho SY, Bhuiyan MJ, Kim KH, Lee SJ. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *Br J Nutr,* 2010, 104, 180-188.

Encalada MA, Hoyos KM, Rehecho S, Berasategi I, de Ciriano MG, Ansorena D, Astiasarán I, Navarro-Blasco I, Cavero RY, Calvo MI. Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line. *Plant Foods Hum Nutr,* 2011, 66, 328-334.

Espley RV, Butts CA, Laing WA, et al. Dietary flavonoids from modified apple reduce inflammation markers and modulate gut microbiota in mice. *J Nutr*, 2014, 144, 146-154.

Farmakološka i biokemijska svojstva ružmarinske kiseline, 2016., pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281792#section=Pharmacology-and-Biochemistry, pristupljeno 8.10.2016

Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: evidence from animal studies. *J Nutr*, 2003, 133, 3275S-3284S.

Gale AJ. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol Pathol*, 2011, 39, 273-280.

Guerrero L, Castillo J, Quinones M, et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS One*, 2012, 7, e49493.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 451-457.

Haddad AQ, Venkateswaran V, Viswanathan L, Teahan SJ, Fleshner NE, Klotz LH. Novel antiproliferative flavonoids induce cell cycle arrest in human prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2006, 9, 68-76.

Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci*, 2010, 11, 1365-1402.

Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, 2002, 96, 67–202.

Hidalgo M, Martin-Santamaria S, Recio I, et al. Potential anti-inflammatory, anti-adhesive, anti/estrogenic, and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities of anthocyanins and their gut metabolites. *Genes Nutr*, 2012, 7, 295-306.

Hsiu -Fang Y, Sheng -Yang W, Chin -Chung W, Wan -Yu L, Tung -Ying W, Fang -Rong C, Chin-Kun W. Cytotoxicity, Anti-Platelet Aggregation Assay and Chemical Components Analysis of Thirty-Eight Kinds of Essential Oils. *J Food Drug Anal*, 2012, 20, 478-483.

Jeung IC, Jee D, Rho CR, Kang S. *Melissa Officinalis* L. Extracts Protect Human Retinal Pigment Epithelial Cells against Oxidative Stress-Induced Apoptosis. *Int J Med Sci*, 2016, 13, 139-146.

Jiang W, Hu M. Mutual interactions between flavonoids and enzymatic and transporter elements responsible for flavonoid disposition via phase II metabolic pathways. *RSC Adv*, 2012, 2, 7948-7963.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija, 11. izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 598-599.

Kumar S, Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *ScientificWorldJournal*, 2013, Article ID 162750.

Kuštrak D. Farmakognozija Fitofarmacija. Zagreb, Golden marketing - Tehnička knjiga, 2005, str. 234-237.

Lotito SB, Zhang WJ, Yang CS, Crozier A, Frei B. Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51, 454-463.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, 2004, 79, 727– 47.

Obulesu M, Rao DM. Effect of plant extracts on Alzheimer's disease: An insight into therapeutic avenues. *J Neurosci Rural Pract*, 2011, 2, 56-61.

Paniccia R, Priora R, Alessandrello Liotta A, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*, 2015, 11, 133-148.

Patora J, Klimek B. Flavonoids from lemon balm (*Melissa officinalis* L., *Lamiaceae*). *Acta Pol Pharm*, 2002, 59, 139-143.

Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, et al. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on *ex vivo* platelet function. *Thromb Res*, 2002, 106, 191-197.

Pereira RP, Fachinetto R, de Souza Prestes A, Puntel RL, Santos da Silva GN, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Bürger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JB. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res*, 2009, 34, 973-983.

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72, 1150–1155.

Podaci o raširenosti i troškovima kardiovaskularnih bolesti, 2016., www.who.int, pristupljeno 7.5.2016

Pregled biofarmaceutskih svojstava flavonoida, 2016., lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/flavonoids, pristupljeno 7.5.2016

Pregled upotreba uređaja Multiplate® Analyser, 2016., www.cobas.com, pristupljeno 25.7.2016

Pregled upotreba uređaja Multiplate® Analyser, 2016., www.ecomeds.ru, pristupljeno 9.10.2016

Pregled zdravstvenih koristi flavonoida, 2016., lurj.org/issues/volume-3-number-2/flavonoids, pristupljeno 11.8.2016

Rothwell JA, Urpi-Sarda M, Boto-Ordonez M, et al. Systematic analysis of the polyphenol metabolome using the Phenol-Explorer database. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60, 203-211.

Sansone R, Rodriguez-Mateos A, Heuel J, et al. Cocoa flavanol intake improves endothelial function and Framingham Risk Score in healthy men and women: a randomised, controlled, double-masked trial: the Flaviola Health Study. *Br J Nutr*, 2015, 114, 1246-1255.

Sažeci opisa svojstava lijekova koji se koriste kao antiagregacijska terapija - nuspojave, 2016., www.halmed.hr, pristupljeno 11.8.2016

Slikovni prikaz adhezije, agregacije i aktivacije trombocita, 2016., usmle287.wordpress.com/2012/09/25/platelet-adhesionaggregationactivation, pristupljeno 9.10.2016

Spencer JPE, Schroeter H, Crossthwaithe AJ, Kuhnle G, Williams RJ, Rice-Evans C. Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31, 1139-1146.

Suh Y, Afaq F, Johnson JJ, Mukhtar H. A plant flavonoid fisetin induces apoptosis in colon cancer cells by inhibition of COX2 and Wnt/EGFR/NF-kappaB-signaling pathways. *Carcinogenesis*, 2009, 30, 300-307.

Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg*, 2009, 108, 1433-1446.

Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr*, 2008, 3, 115-126.

Wallén H, Ladjevardi M, Albert J, Bröijersén A. Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood; a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin. *Thromb Res*, 1997, 87, 151-157.

Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*, 2004, 36, 838-849.

Xiao J, Kai G. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2012, 52, 85-101.

Yamagishi M, Natsume M, Osakabe N, et al. Effects of cacao liquor proanthocyanidins on PhIP-induced mutagenesis *in vitro*, and *in vivo* mammary and pancreatic tumorigenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett*, 2002, 185, 123-130.

Yardumian DA, Mackie IJ, Machin SJ. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. *J Clin Pathol*, 1986, 39, 701-712.

8. SAŽETAK

SAŽETAK

Kardiovaskularne bolesti uzimaju sve više života i povećavaju teret zdravstvenih sustava. Pacijenti s poviješću tromboembolijskih poremećaja moraju dulje vremena, a nekad i doživotno uzimati antiagregacijsku terapiju koja uzrokuje raznovrsne nuspojave. Sigurna i učinkovita farmakoterapija tromboembolijskih bolesti jedan je od važnih ciljeva farmaceutske struke čijim bi se ostvarenjem postiglo i smanjenje potrošnje zdravstvenih sustava.

Polifenoli, posebice flavonoidi, su spojevi koji se nalaze u biljkama i koji posebno obećavaju kad su u pitanju prevencija i terapija raznih kardiovaskularnih pa tako i tromboembolijskih bolesti. Matičnjak je mediteranska biljka s dugo poznatim blagotvornim svojstvima. U ovome radu proučavao se antiagregacijski učinak etanolnog ekstrakta lista matičnjaka, a metoda koja se koristila je trombocitna impedancijska agregometrija.

Nakon podvrgavanja dobivenih rezultata statističkoj analizi zaključuje se da ekstrakt matičnjaka ima zamjetno antiagregacijsko djelovanje koje bi se moglo iskoristiti za daljnja istraživanja koja su potrebna kako bi se u potpunosti razumjelo na koji se način događa inhibicija agregacije i kako bi se našao način da se ove spoznaje potencijalno primjene u farmakoterapiji tromboembolijskih bolesti.

SUMMARY

Cardiovascular diseases take the increasing nuber of lives and increase the burden on healthcare systems. Patients with history of thromboembolic disorders must take antiaggregatory therapy for extended period of time and sometimes for life. That therapy can cause various side effects. Safe and efficient pharmacotherapy of the thromboembolic disorders is one of the important goals of pharmacy which, if achieved, would lead to decrease of expenditure in healthcare.

Polyphenols, especially flavonoids, are compounds found in plants which show the most promising results when prevention and therapy of various cardiovascular diseases and thromboembolic disorders is considered. Lemonbalm is mediterranean plant with long known beneficial properties. This thesis studies the antiaggregatory effect of ethanolic extract of lemonbalm leaves. The method used to measure that effect was impedance aggregometry.

After statistical analysis of the results it can be concluded that lemonbalm extract does have a notable antiaggregatory properties that should be examined further in the future research, which is neccessary to gain a full understanding of the mechanism in which the inhibition of aggregation takes place and to find a suitable way in which these findings could be used in the pharmacotherapy of thromboembolic disorders.

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

ODREĐIVANJE ANTIAGREGACIJSKOG UČINKA ETANOLNIH EKSTRAKTA LISTA MATIČNJAKA

Ivan Novaković

SAŽETAK

Kardiovaskularne bolesti uzimaju sve više života i povećavaju teret zdravstvenih sustava. Pacijenti s poviješću tromboembolijskih poremećaja moraju dulje vremena, a nekad i doživotno uzimati antiagregacijsku terapiju koja uzrokuje raznovrsne nuspojave. Sigurna i učinkovita farmakoterapija tromboembolijskih bolesti jedan je od važnih ciljeva farmaceutske struke čijim bi se ostvarenjem postiglo i smanjenje potrošnje zdravstvenih sustava.

Polifenoli, posebice flavonoidi, su spojevi koji se nalaze u biljkama i koji posebno obećavaju kad su u pitanju prevencija i terapija raznih kardiovaskularnih pa tako i tromboembolijskih bolesti. Matičnjak je mediteranska biljka s dugo poznatim blagotvornim svojstvima. U ovome radu proučavao se antiagregacijski učinak etanolnog ekstrakta lista matičnjaka, a metoda koja se koristila je trombocitna impedancijska agregometrija.

Nakon podvrgavanja dobivenih rezultata statističkoj analizi zaključuje se da ekstrakt matičnjaka ima zamjetno antiagregacijsko djelovanje koje bi se moglo iskoristiti za daljnja istraživanja koja su potrebna kako bi se u potpunosti razumjelo na koji se način događa inhibicija agregacije i kako bi se našao način da se ove spoznaje potencijalno primjene u farmakoterapiji tromboembolijskih bolesti.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 13 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 51 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: matičnjak, antiagregacijsko djelovanje, impedancijska agregometrija

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

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

Rad prihvaćen: Travanj, 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

DETERMINATION OF ANTIAGGREGATORY EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACTS OF LEMONBALM LEAVES

Ivan Novaković

SUMMARY

Cardiovascular diseases take the increasing nuber of lives and increase the burden on healthcare systems. Patients with history of thromboembolic disorders must take antiaggregatory therapy for extended periods of time and sometimes for life. That therapy can cause various side effects. Safe and efficient pharmacotherapy of the thromboembolic disorders is one of the important goals of pharmacy which, if achieved, would lead to decrease of expenditure in healthcare.

Polyphenols and especially flavonoids are compounds found in plants which show the most promise when prevention and therapy of various cardiovascular diseases and therefore thromboembolic disorders is considered. Lemonbalm is mediterranean plant with long known beneficial properties. This thesis studies the antiaggregatory effect of ethanolic extract of lemonbalm leaves. The method used to measure that effect was impedance aggregometry.

After statistical analysis of the results it can be concluded that lemonbalm extract does have a notable antiaggregatory properties that should be examined further in the future research which is neccessary to gain a full understanding of the mechanism in which the inhibition of aggregation takes place and to find a suitable way in which these findings could be used in the pharmacotherapy of thromboembolic disorders.

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

Thesis includes: 45 pages, 13 figures, 1 table and 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: lemonbalm, antiaggregatiory effect, impedance aggregometry

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

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

Željan Maleš, **Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Miranda Sertić, **Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April, 2017.