Antiagregacijsko djelovanje flavonoida

Babić, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

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:163:084602

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-21**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Babić

ANTIAGREGACIJSKO DJELOVANJE FLAVONOIDA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Babić

ANTIAGREGACIJSKO DJELOVANJE FLAVONOIDA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Mirza Bojić

Prof. dr. sc. Renata Zadro

Zagreb, 2020.

University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Ivana Babić

ANTIAGGREGATORY EFFECT OF FLAVONOIDS

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Assoc. Prof. Mirza Bojić, PhD

Prof. Renata Zadro, PhD

Zagreb, 2020

Zahvale

Zahvaljujem svojim mentorima, izv. prof. dr. sc. Mirzi Bojiću na vođenju i viziji, vremenu, brizi i savjetima za doktorande, te optimizmu kojim je održavao moj radni elan i prof. dr. sc. Renati Zadro na ukazanom povjerenju, suradnji i konstruktivnim savjetima.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Ireni Jukić, ravnateljici Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu koja svesrdno podupire znanstveni rad Zavoda i omogućuje nastavak znanstvene naobrazbe svojih djelatnika.

Hvala dr. sc. Hrvoju Rimcu, Ivanu Duki, mag. pharm., i Dobrili Blagaić, mag., pharm. na velikoj pomoći u eksperimentalnom radu.

Hvala dr. sc. Maji Tomičić na stručnim savjetima, znanju koje nesebično dijeli te zaraznom znanstvenom entuzijazmu, Nini na savjetima i pomoći u organizaciji eksperimentalnog rada, Maji na strpljivosti i pomoći u eksperimentalnom radu, te Ljubici i Marini na gostoprimstvu.

Hvala Koraljki Gojčeta, mag. med. biokemije, i njenim tehničarkama Ivani i Saneli na susretljivosti, stručnim savjetima i uvijek dobroj volji.

Hvala doc. dr. sc. Antoniji Jurak Begonja koja se odazvala na svaki moj upit i udijelila mi korisne savjete vezane uz protočnu citometriju trombocita.

Hvala mojim dragim kolegicama i kolegama u Odjelu za molekularnu dijagnostiku; voditeljici Odjela, dr. sc. Jasni Bingulac-Popović, na podršci i slobodi u organizaciji mog radnog vremena, te vrijednim i samostalnim tehničarima koji su mi omogućili da nesmetano i bezbrižno izvedem eksperimentalni dio znanstvenog rada.

Hvala Katarini koja je uvijek bila spremna pomoći mi u pripremanju otopina.

Hvala dr. Snježani Milković i Valentini na pomoći u prikupljanju uzoraka.

Hvala Marijani, mojoj dragoj prijateljici, na strpljenju i svim savjetima.

Hvala mojoj mami, tati, sestri i prijateljima na svim riječima ohrabrenja i podrške.

Najveće hvala Milivoju, jer je uvijek tu za mene, Adriana i Mašu.

SAŽETAK

Uvod: Flavonoidi su heterociklički spojevi iz prirode koje unosimo hranom. Antiagregacijska terapija u kardiovaskularnim bolestima ima ozbiljne nuspojave krvarenja u gastrointestinalni trakt. Flavonoidi pokazuju antiagregacijsko djelovanje čiji mehanizam nije rasvijetljen. Njegovo razumijevanje omogućilo bi upotrebu flavonoida kao dostupne i neškodljive opcije u antiagregacijskoj terapiji.

Materijali i metode: Određeni su kromatografski parametri lipofilnost 21 flavonoida: čimbenik zadržavanja R_F i hidrofobni parametar R_M. Vrijednosti R_M uspoređene su s logaritmom koeficijenta razdijeljenja, log*P*, izračunatim putem programskih aplikacija. Impedancijskom agregometrijom određena je minimalna antiagregacijska koncentracija flavanona, ispitano pojačano antiagregacijsko djelovanje inhibitora enzima fosfolipaze C, ciklooksigenaze i inhibitora Ca^{2+}-kanala u prisutnosti flavanona, te antiagregacijsko djelovanje kombinacija flavanona, 6-hidroksiflavona i pinocembrin-7-metiletera. Protočnom citometrijom ispitano je smanjenje aktivacije trombocita nakon inkubacije s flavanonom, praćenjem ekspresije aktivnog oblika integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Rezultati: Određeni su kromatografski parametri R_M, u rasponu od -0,5942 za luteolin do 0,5202 za tektokrizin i krizin-dimetileter. Snažna pozitivna korelacija prisutna je između log*P* programskih aplikacija i R_M ($r=0,66\text{-}0,93$ $p<0,05$). Flavanon postiže izuzetno niske minimalne antiagregacijske koncentracije, značajno pridonosi djelovanju inhibitora enzima fosfolipaze C, te nešto slabije inhibitoru Ca^{2+}-kanala dok djelovanju inhibitora ciklooksigenaze ne pridonosi. U kombinacijama s drugim flavonoidima, flavanon ostvaruje značajno povećan antiagregacijski učinak. Djelovanjem flavanona smanjena je pojavnost aktiviranog oblika integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, markera aktivacije trombocita

Zaključci: Lipofilnost flavonoida i njihovo inhibicijsko djelovanje na fosfolipazu C omogućuju sveobuhvatnost antiagregacijskog djelovanja flavonoida. Minimalne antiagregacijske koncentracije flavanona ostvarive su u plazmi nakon unosa prehranom te uz pojačano djelovanje kombinacije flavonoida predstavljaju osnovu moguće primjene flavonoida kao dopune antiagregacijskoj terapiji.

Ključne riječi: *flavonoidi, flavanon, logP, R_M, lipofilnost, impedancijska agregometrija, PLC, COX-1, kalcijevi kanali, inhibitori, protočna citometrija, PAC-1*

SUMMARY

BACKGROUND

Flavonoids are widely studied natural polyphenolic compounds because of their beneficial effects on human health. They are present in wide spectrum of plants. One of the most important benefit which has been confirmed in epidemiological studies is known as *French paradox*, which describes contradictory findings in French population which consumes fat-rich diet and yet incidence of cardiovascular diseases is lower than expected. Researchers found high on polyphenol-diet as a main reason for this observation. Flavonoids accessibility to humans through dietary intake of fruits, vegetables and beverages, introduced them as a promising topic of research for novel pharmaceutical agents. Cardiovascular diseases are multifactorial chronic diseases which represent a leading cause of morbidity and mortality in developed countries and still lack adequate therapeutic option. Conventional drugs prescribed in case of CVD are antithrombotic agents. Their use if often accompanied with serious side-effects as bleeding in the gastrointestinal tract.

Based on significant number of *in vitro* studies on plant and fruit extracts or on pure flavonoid compounds, flavonoids exhibit antiaggregatory effect in dose depending manner. Although without completely revealed mechanism of action, for some flavonoids this effect is attributed to the inhibition of cyclooxygenase, lipoxygenase, tyrosine-kinase, phosphodiesterase or phospholipase which participate in platelet signaling pathway. Results from previous studies point to positioning of flavonoids within cell membrane with more hydrophobic ones located deeper in the core of membrane bilayer where they interact with membrane transporter proteins and decrease membrane fluidity. Platelet membrane functions as dynamic structure involved in processes of activation and aggregation which depend strongly on phospholipid transverse distribution in resting and activated state.

Determining potential drugs lipophilicity helps to understand their absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and toxicity (ADMET). Lipinski's "rule-of-five" represents milestone for determination of relationship between pharmacokinetic and physicochemical parameters with one of the rules including log*P* as a measurement of compound's lipophilicity. Partition coefficient (*P*) represents a ratio between concentration

of non-ionized form of compound in *n*-octanol-water system expressed in logarithmic scale (log*P*). Nowadays, laborious and time-consuming shake-flask method for log*P* determination is often replaced by simple approach for lipophilicity determination by planar chromatography which expresses chromatographic parameter R_M (parameter calculated based on substance retention factor) as a surrogate measurement of lipophilicity. For theoretical prediction of lipophilicity (log*P*) by computational approaches, databases of predefined atoms, fragments and their contribution factors have been created.

The hypothesis of this doctoral thesis assumes that the antiaggregatory action of flavonoids is based on the tendency for their placement in the platelet membrane lipid bilayer due to their lipophilicity. By such placement, they reduce membrane fluidity resulting in decreased expression of the active form of platelet activation receptor located on platelet membrane and a decrease in platelet activation and aggregation. This mechanism represents the basis of antiaggregatory action to all flavonoids.

Aim of this doctoral thesis are investigation of possible flavonoid-membrane interaction based on their lipophilicity, expressed as log*P*, and by determining the expression of the active form of platelet activation receptor integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ before and after the action of flavonoids. In addition, mechanism of flavonoid action was examined on the model of platelet aggregation induced with different agonists in the presence of flavanone and specific inhibitors for PLC, COX-1 enzymes and calcium channel inhibitors. Biopotency of flavonoid was explored by determining the minimal antiaggregatory concentration of flavanone and inhibitory effect of two flavonoids with different aggregation.

EXPERIMENTAL

Blood samples were collected at Croatian Institute of Transfusion Medicine in vacutainer tubes with tri-sodium citrate (3.2%) as anticoagulant. Fifty blood donors who were not on any antiaggregatory therapy gave written, informed consents before participating in research. Study was conducted according to Helsinki declaration and with approval of Ethics Committee of the Croatian Institute of Transfusion Medicine and the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Blood samples were used for impedance aggregometry and flow cytometry experiments.

Lipophilicity determination. Twenty-one flavonoid compounds were analysed by reverse-phase thin-layer chromatography (RP-TLC) using acetonitrile: water: glacial acetic acid in ratio 66: 33: 1 (V/V/V) as a mobile phase. Based on retention factor, R_F, chromatographic parameter R_M was calculated as follows $R_M = \log (1/R_F - 1)$. Theoretical log*P* was calculated by using online applications *Chemicalize* (https://chemicalize.com), *ChemSketch* (http://www.chemspider.com), *Molinspiration* (https://www.molinspiration.com) and *SwissADME* (http://www.swissadme.ch).

Impedance aggregometry. The principle of the method is the aggregation of activated platelets on metal electrodes which creates an increase in a continuously measured electrical resistance. Impedance aggregometry on whole blood was used for determination of minimal antiaggregatory concentration (*MINaAC*) of flavanone in the presence of set of agonists (TRAP-6, ADP, collagen, AA, ristocetin). *MINaAC* was measured as influence of serial doubling concentrations of flavanone on platelet aggregation. Vehicle (DMSO) was used as negative control. For the assessment of combined effect of inhibitory drugs (U73122 hydrate, verapamil hydrochloride, indomethacin) and flavanone, measurements were conducted with TRAP-6 and ADP using 15 and 60 x *MINaAC* of flavanone for observation of repeatable platelet aggregation inhibition. The antiaggregatory effect of flavanone in combination with pinocembrin-7-methyl ether and 6-hydroxyflavones was measured in presence of agonists ADP, TRAP-6, collagen, and AA. In all measurements, DMSO as a vehicle was used for a negative control.

Flow cytometry. Platelet rich plasma (PRP) was pre-incubated with different concentration of flavanone or with vehicle as a control (DMSO) for 15 minutes at 37 °C. An aliquot of treated PRP (flavanone, DMSO) was mixed with agonist TRAP-6, anti-CD61 (PE) and PAC-1 FITC) to monitor activated form of integrin αIIbβ3. The sample was incubated in the dark at 37 °C, for 30 min. Activated platelets were assessed as percentage of CD61 PAC-1 positive events.

Statistical analysis. Experimentally determined chromatographic parameter R_M was correlated with calculated log*P*, reported as correlation coefficient and adjusted squared correlation coefficient at a significance level of $p < 0.05$. The antiaggregatory effect of flavanone and inhibitor drugs were assessed with one-way ANOVA test with *post hoc* Tukey

analysis for multiple comparison. Paired Student's *t*-test was used for estimation of *MINaAC* and platelet activation inhibition measured by flow cytometry.

RESULTS

Lipophilicity of flavonoids. The R_M parameters experimentally determined for group of 21 flavonoid compound ranged from -0.5942 to 0.5202. The highest R_M values were observed for tectochrysin and chrysin-dimethyl ether as the most lipophilic and the lowest for luteolin as the most hydrophilic compound. Log*P* values ranged from 2.18 for tangeretin to 3.28 for pinocembrin-7-methyl ether according to the *Chemicalize* application. According to the *ChemSketch* application, pinocembrin-7-methyl ether was the most lipophilic compound with log*P* 4.11 while the least lipophilic flavonoid compound was isorhamnetin (log*P* 1.76). *Molinspiration* and *SwissADME* calculated the lowest log*P* values for quercetin (log*P* 1.68 and 1.23), whereas, according to *Molinspiration*, the most lipophilic flavonoid was tangeretin (log*P* 3.78) and by *SwissADME* calculation flavone (log*P* 3.18). There was a strong positive correlation between multiple log*P* calculated by *Molinspiration* and R_M values ($r = 0.93$ $p < 0.001$) and log*P* of the *SwissADME* and R_M values ($r = 0.86$ $p < 0.001$). The values of log*P* obtained through *ChemSketch* and *Chemicalize* showed a moderate positive correlation ($r = 0.55$, $p < 0.01$, $r = 0.44$ $p < 0.05$) with the values of the hydrophobic parameter R_M.

Relationship between inhibition of platelet aggregation and lipophilicity of flavonoids. There was no correlation between *MINaAC* and theoretical log*P* when the group of 21 flavonoids was observed. A statistically significant strong negative correlation was found for the flavone group ($r = -0.76$, $p < 0.01$) and a moderate negative correlation for joint flavone and flavanone group ($r = -0.59$, $p < 0.05$) *Chemicalize* log*P* values and *MINaAC.*

Minimal antiaggregatory concentration of flavanone. The lowest value of *MINaAC* (0.063 μM) for flavanone was observed when inhibition of ADP induced platelet aggregation was measured, while when TRAP-6 induced platelet aggregation was measured, flavanone showed inhibitory effect at 2.000 μM.

Flavanone significantly reduced PLC activity ($p < 0.01$) in combination with U-73122 compared to activity of U-73122 on its own, irrespective which agonist was used,

TRAP-6, ADP or collagen. Again, flavanon did not potentiate the inhibitory activity of indomethacin and therefore did not show an effect on COX-1 enzyme activity, regardless of the agonists used (TRAP-6, ADP, AA). The enhanced inhibitory effect of verapamil with flavanone on calcium channels was observed only with the strong agonist TRAP-6 ($p < 0.05$), whereas no statistically significant difference in anti-aggregatory effect was observed in the presence of weak agonist ADP for combination of flavanones and verapamil.

When combined antiaggregatory effect of flavonoid combinations applied at their *MINaAC* concentrations was examined, statistically significant difference between results for negative control (DMSO), each flavonoid (flavanone, 6-hydroxyflavone, pinocembrin-7-methylether) and flavonoid combinations was observed. Combination of flavanone and 6-hydroxyflavone, flavanone and pinocembrin-7-methylether, and 6-hydroxyflavone and pinocembrin-7-methylether reached significant platelet aggregation inhibition with TRAP-6, ADP and AA as agonists, while none of the flavonoid combination had a statistically significant enhanced antiplatelet effect on collagen induced aggregation. The combination of flavanones and 6-hydroxyflavones produced significantly enhanced inhibition of platelet aggregation with TRAP-6 ($p < 0.05$), ADP ($p < 0.01$) and AA ($p < 0.01$) as agonists. The combination of flavanone and pinocembrin-7-methylether with ADP showed a statistically significant joint effect ($p < 0.05$) that was absent with TRAP-6 as agonist. Pinocembrin-7-methyl ether had statistically significant stronger antiaggregatory activity combined with 6-hydroxyflavone in the presence of AA as an inducer ($p < 0.01$).

Inhibitory effect of flavanone on platelet activation is dose dependent in the flow cytometry experiments ($r = 0.9897$, $p < 0.05$). Statistically significant reduction in receptor exposition is achieved only at higher concentrations of flavanone (488 μmol/L) when compared to the untreated samples of same participant ($p < 0.01$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The scientist's continuous interest in examining the mechanism of the observed beneficial properties of flavonoids has not waned. One of the most interesting research fields is the antiaggregatory effect of flavonoids, as it is imposed as a possible option for adjunctive therapy to conventional, not effective enough, and in addition, therapy which causes serious side effects such as bleeding in the gastrointestinal tract. Based on strong positive correlation between R_M parameter and log*P* calculated by *Molinspiration* and *SwissADME* application

and moderate positive correlation with *ChemSketch* and *Chemicalize* log*P*, it can be concluded that chromatographic parameter R_M is good surrogate of log*P* and a good predictor of flavonoid lipophilicity. As a measure of lipophilicity, log*P* offers very convenient way of predicting possible extent of flavonoid action *in vivo* based on their interaction with bio-membranes. Although the *Chemicalize* log*P* calculations showed a moderately positive correlation with RP-TLC R_M values, when testing the association of minimum antiaggregatory concentration, a strong negative correlation was found for the flavone group and a moderate negative when the flavone and flavanone group were considered together. This is consistent with the expectation that a higher log*P* value, i.e. higher lipophilicity, also implies a higher biological activity of the selected flavonoid group and therefore a lower concentration required to observe their inhibitory effect. In the context of platelets, membrane retention could give importance to flavonoids with the highest log*P* values. The influence of flavonoids on the platelet membrane could greatly modulate their aggregation capacity. This could lead to a decrease in the fluidity of the lipid layer, thereby stabilizing the platelet membrane. Flavanone exerts a statistically significant minimal antiaggregatory effect with all agonists at concentrations achievable through the diet, and given the enhanced effect of the flavonoid combination on the inhibition of aggregation, it can be concluded that, in the context of a diverse diet, an inhibitory effect on platelet aggregation is possible. The impedance aggregometry method obtained the results of testing the comprehensiveness of flavonoids. In combination with specific PLC inhibitors, COX-1 and Ca^{2+} channel inhibitors, the results indicate that flavanone, act on the PLC enzyme level when aggregation was TRAP-6, ADP and collagen induced. Inhibition of Ca^{2+} channels by flavanone is only achieved in the case of TRAP-6 induced aggregation. The absence of combined inhibitory influence of flavanone and indomethacin regardless of agonist used, indicates that antiaggregatory effect of flavanone is not achieved downstream of COX-1. Following incubation with flavanone, there was a decrease in the platelet membrane exposure of the active conformation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ detected by PAC-1 antibody. Only rather high concentration of flavanone (488 μM) achieved significant inhibition of platelet activation. Although they present complementary methods, flow cytometry and impedance aggregometry comprise different aspects of platelet function. By performing in whole blood, impedance aggregometry enables other blood elements to influence platelet aggregation and with that allows reaction to be carried out under more physiological conditions.

Platelet membrane stabilization by flavonoids has been supported by flow cytometry and impedance aggregometry experiments with specific enzyme inhibitors of platelet aggregation signaling pathways. Flavonoids lipophilicity and membrane stabilization, to some extent, contributes to their antiaggregatory effect.

Keywords: *flavonoids, flavanone, logP, R_M, lipophilicity, impedance aggregometry, PLC, COX-1, calcium channels, inhibitors, flow cytometry, PA*

Sadržaj

1 UVOD 1

1.1 Flavonoidi 2

1.1.1 Podjela i struktura 2

1.1.2 Zastupljenost u prehrani 3

1.1.3 Bioraspoloživost 4

1.2 Flavonoidi i kardiovaskularne bolesti 5

1.2.1 Flavonoidi u očuvanju zdravlja 5

1.2.2 Francuski paradoks 6

1.2.3 Agregacija trombocita na mjestu ozlijede krvne žile 7

1.2.4 Arterijska tromboza 8

1.2.5 Antiagregacijska terapija 9

1.2.6 Mehanizam antiagregacijskog djelovanja flavonoida 10

1.3 Određivanje lipofilnosti spojeva 13

1.3.1 Molekulski deskriptori lipofilnosti 13

1.3.2 Interakcija flavonoida s biomembranama 15

2 CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA 16

3 MATERIJALI I METODE 19

3.1 Materijali 20

3.1.1 Uzorci krvi 20

3.1.2 Ploče za tankoslojnu kromatografiju, flavonoidi 20

3.1.3 Agonisti impedancijske agregometrije 21

3.1.4 Fluorescentna antitijela za protočnu citometriju, plazma bogata trombocitima 22

3.2 Metode 23

3.2.1 Obrnuto fazna takoslojna kromatografija 23

3.2.2 Izračun teoretskog log*P* 23

3.2.3 Utvrđivanje odnosa eksperimentalnih i računalnih parametara lipofilnosti 24

3.2.4 Utvrđivanje odnosa parametara lipofilnosti i *MINaAC* 24

3.2.5 Impedancijska agregometrija 24

3.2.5.1 Određivanje *MINaAC* flavanona 27

3.2.5.2 Ispitivanje utjecaja kombinacija lijekova i flavonoida na *MINaAC* 28
3.2.5.3 Ispitivanje djelovanje kombinacije dva flavonoida na agregaciju trombocita 30
3.2.5.4 Praćenje aktivacije trombocita metodom protočne citometrije s fluorescentno označenim protutijelima 31
3.2.6 Statističke metode 33
4 REZULTATI 34
4.1 Parametri lipofilnosti 35
4.1.1 Kromatografski parametar R_M 35
4.1.2 Računalne vrijednosti log*P* 37
4.1.3 Povezanost eksperimentalnih i računalnih vrijednosti parametara lipofilnosti 39
4.1.4 Povezanost računalnih vrijednosti parametara lipofilnosti i antiagregacijskog učinka 39
4.2 Antiagregacijski učinak flavonoida 42
4.2.1 Određivanje *MINaAC* flavanona 42
4.2.2 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora PLC (U-73122), COX-1 (indometacin) i kalcijevih kanala (verapamila) na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona 44
4.2.2.1 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora PLC (U-73122) na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona 44
4.2.2.2 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora COX-1 (indometacina) na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona 46
4.2.2.3 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora kalcijevih kanala (verapamila) na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona 48
4.2.3 Povećanje inhibitornog djelovanja 6-hidroksiflavona i pinocembrin-7-metiletera na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona 49
4.3 Utjecaj flavonoida na aktivaciju trombocita (površinsku ekspresiju receptora) 51
5 RASPRAVA 54
5.1 Lipofilnost flavonoida 55
5.1.1 Povezanost kromatografskih i računalnih parametara lipofilnosti 55
5.1.2 Povezanost računalnih parametara lipofilnosti i aktivnosti flavonoida 57
5.2 Određivanje *MINaAC* flavanona 59
5.3 Povećanje djelovanje *MINaAC* 6-hidroksiflavona i pinocembrin-7-metiletera na agregaciju trombocita u prisustvu *MINaAC* flavanona 61

5.4 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora PLC, COX-1 i kalcijevih kanala na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona 62
5.5 Praćenje smanjenja aktivacije trombocita metodom protočne citometrije s fluorescentno označenim antitijelima za marker aktivacije integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC-1) 64
6 ZAKLJUČCI 66
7 POPIS KRATICA I SIMBOLA 69
8 LITERATURA 72
9 PRILOZI 109
9.1 Prilog 1 109
9.2 Prilog 2 109
10 ŽIVOTOPIS 109
11 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 112

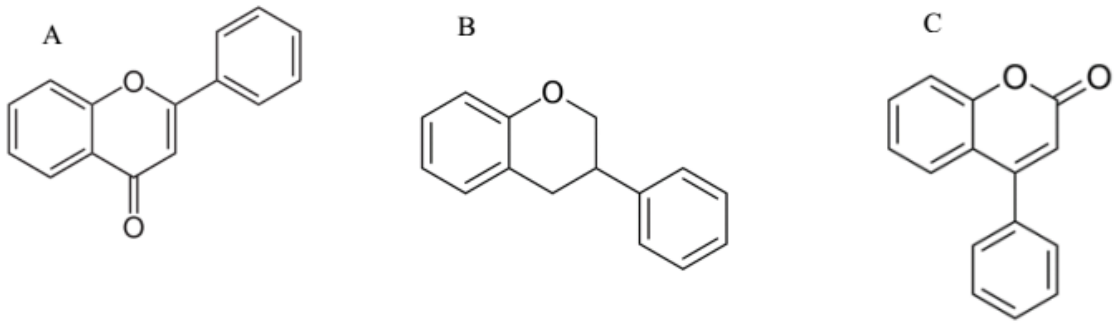
1 UVOD

1.1 Flavonoidi

Flavonoidi su grupa polifenolnih spojeva široko zastupljenih u biljnom svijetu kao njihovi sekundarni metaboliti. Ime im potječe od latinske riječi *flavus* što znači žut. Flavonoidi su odgovorni za boju većine cvijeća, voća i sjemenki, a njihov rastući broj se procjenjuje na više od 8000 spojeva (Olsen i sur., 2009). U biljkama imaju mnogostruke zadaće među kojima su privlačenje insekata oprašivača bojom i mirisom cvijeća, zatim zaštita od UV zračenja, zaštita od mikroba i dr. (Panche i sur., 2016).

1.1.1 Podjela i struktura

Flavonoidi u širem smislu obuhvaćaju flavone (derivati 2-fenil-1,4-benzopirona), izoflavonoide (derivati 3-fenil-1,4-benzopirona) i neoflavonoide (derivati 4-fenil-1,2 benzopirona) (slika 1). Osnovni kostur spoja sastoji se od dva benzenska (A i B) i jednog heterocikličnog prstena (C) u obliku C_6-C_3-C_6.

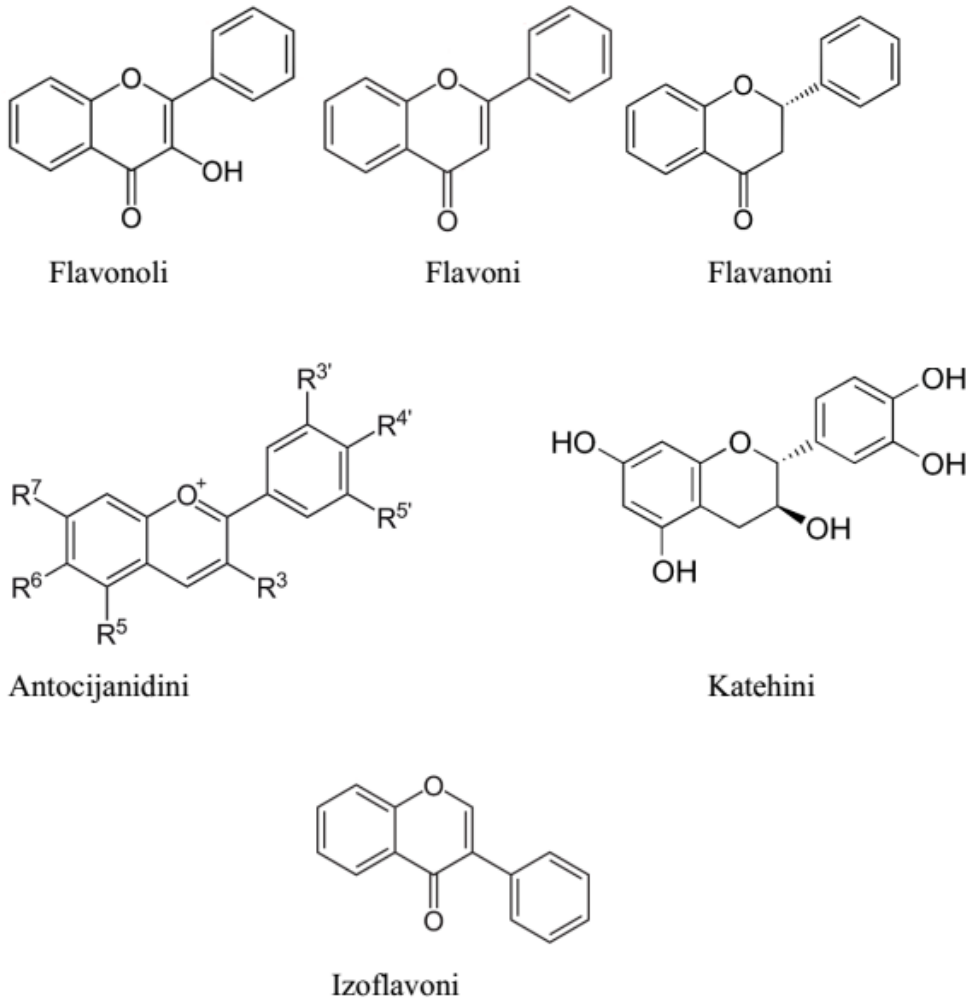


Slika 1. Osnovna struktura flavona (A), izoflavonoida (B) i neoflavonoida (C)

Različite vrste flavonoida razlikuju se po stupnju oksidacije i obrascu supstitucije prstena C, dok se pojedinačni spojevi unutar klase razlikuju po obrascu supstitucije prstenova A i B (Middleton, 1998). Šesteročlani prsten spojen na benzenski prsten je ili α-piron (flavonoli i flavononi) ili njegov dihidroderivat (flavanol i flavanon).

1.1.2 Zastupljenost u prehrani

Flavonoidi su otkriveni 1930. godine kao novi spoj izoliran iz limuna. Smatralo se da je otkriven novi vitamin, koji je nazvan vitamin P (Scarborough, 1945), no taj se termin više ne koristi (Vickery i sur., 1950). Flavonoidi su sastojak svakodnevne ljudske prehrane i to podgrupama flavonola, flavona, antocijanidina, katehina, flavanona i izoflavona (Aherne i O'Brien, 2002), a najzastupljeniji su izoflavoni, flavonoli i flavoni (Kumar and Pandey, 2013) (slika 2).



Slika 2. Kemijske strukture osnovnih podgrupa flavonoida

Flavonoli (npr. kvercetin, miricetin) su najzastupljeniji u lisnatom povrću, jabukama, luku, brokuli i bobičastom voću. Flavoni (npr. apigenin i luteolin) su prisutni u žitaricama, lisnatom povrću i začinima a antocijanidini u grožđu, šumskom voću i crnom ribizlu. Katehinima (npr. katehin i epikatehin) su bogati čajevi, jabuke, grožđe, čokolada i crno vino. Flavanoni (npr. naringenin i hesperetin) su gotovo isključivo zastupljeni u citrusnom voću i

njihovim sokovima dok su izoflavoni (npr. daidzein i genistein) najzastupljeniji u soji (Wang i sur., 2009).

Do danas je poznato više od 500 vrsta polifenola među kojima i flavonoidi koji se nalaze u namirnicama ljudske prehrane (Pérez-Jiménez i sur., 2010). Flavonoidi pripadaju grupi spojeva koji se u engleskom jeziku nazivaju "*nutraceuticals*". Termin je predstavio dr. Stephen De Felice, 1989. za sastojke hrane koji imaju blagotvorno djelovanje na zdravlje uključujući prevenciju i/ili terapiju bolesti (Brower, 1998). Unose se prehranom i stoga ih je lako primijeniti, dostupni su, a njihova konzumacija ne izaziva neželjene učinke (Rossino i Casini, 2019). No treba imati na umu da različite podgrupe flavonoida imaju značajno drugačije biološke i kemijske osobitosti (Erlund, 2004).

1.1.3 Bioraspoloživost

Podaci o dnevnom unosu flavonoida za populaciju neke zemlje ili većih regija u multicentričnim istraživanjima uvelike se razlikuju. U takvim se studijama za podatke o dnevnom unosu namirnica koriste baze podataka kao što je baza o polifenolima u hrani Ministarstva poljoprivrede SAD (USDA ARS, 2019) ili francuska baza *Phenol-Explorer* (Neveu i sur., 2010) u kojima dolazi do stalnog priliva novih podataka o sadržaju i općenito o biološkim osobitostima pojedinih flavonoida iz prehrane.

Tako Zamora-Ros i sur. (2011) zaključuju na osnovu velike multicentrične studije, koja je uključivala europske građane, da dnevni unos flavonoida prehranom ovisi o geografskim regijama i socioekonomskom statusu stanovnika i iznosi od 36,7 do 130,9 mg, s hesperetinom i kvercetinom kao najzastupljenijima (trećina dnevnog unosa), a slijedi ih naringenin (13,3 do 20,8 %). U radu Witkowska i sur. (2015) procijenjen je puno veći dnevni unos flavonoida za poljsku populaciju od 989 mg/dan i uspoređen je s podacima za druge europske države gdje je zanimljivo da je on veći od unosa za grčku populaciju (muškarci 744 mg/dan, žene 584 mg/dan), ali manji od unosa flavonoida prehranom u Francuskoj (1193 mg/dan) i Španjolskoj (1173 mg/dan).

Flavonoidi se u biljkama, odnosno hrani, nalaze većinom kao glikozidi a rijetko kao aglikoni (npr. katehini). U lumenu ili stanicama crijeva, prije apsorpcije se hidrolizom (β-glukozidaza) uklanja glikozidni ostatak da bi se nakon apsorpcije i metabolizma, flavonoidi u krvi nalazili kao glukuronidi ili sulfati (Erlund, 2004). U radu na *Caco-2* stanicama Murota i sur. (2002) ukazuju da je umjerena lipofilnost aglikona izoflavona razlog za učinkovitiju

apsorpciju u enterocite za razliku od njegovih glikozida. Guo i sur. (2013) utvrdili su da mast u hrani poboljšava bioraspoloživost kvercetina povećavajući njegovu apsorpciju, vjerojatno micelarizacijom u tankom crijevu.

Bioraspoloživost flavonoida vrlo je raznolika ako ju promatramo prema grupama, no sveobuhvatno se radi o niskim vrijednostima koje se ostvaruju nakon unosa hranom. Flavonoidi koji se najbolje apsorbiraju su izoflavoni, a slijede ih katehini, flavanoni i kvercetin glikozidi (Manach i sur., 2005). Studije su pokazale da se flavanoni, kao glukuronidni i sulfatni konjugati, u plazmi nalaze u količinama koje čine samo 5-15 % dnevnog unosa flavonoida (Pereira-Caro i sur., 2014). Topivost kvercetina u vodi, kod pH vrijednosti sličnim onima u gastrointestinalnom traktu (pH 2–7), je samo 1,53-12,5 mg/L, što vjerojatno ograničava njegovu difuziju u enterocite i apsorpciju (Pool i sur., 2013). Krogholm i sur. (2010) u svom istraživanju opažaju da se nakon unosa istih količina kvercetina, naringenina i hesperetina, vršna koncentracija naringenina (0,25±0,13 μM) značajno razlikuje od kvercetina (0,15±0,13 μM) i hesperetina (0,18±0,13 μM), te da se kvercetin značajno manje izlučuje iz organizma urinarnom ekskrecijom već se vjerojatno izlučuje putem žuči. Ipak, eliminacija kvercetina je prilično spora, s poluvremenom u rasponu od 11 do 28 sati, što bi moglo pogodovati akumulaciji u plazmi prilikom ponovljenog unosa (Manach i sur., 2005). Općenito gledajući, niska bioraspoloživost flavonoida je ograničavajući čimbenik u njihovoj primjeni i utjecaju na zdravlje (Thilakarathna i Rupasinghe, 2013).

1.2 Flavonoidi i kardiovaskularne bolesti

1.2.1 Flavonoidi u očuvanju zdravlja

Brojne su studije koje se već dugi niz godina bave proučavanjem učinaka flavonoida na zdravlje ljudi. Većina opisanih učinaka može se objasniti djelovanjem flavonoida kao antioksidansa pa se njima mogu pripisati i antioksidacijska svojstva zelenog povrća, voća, maslina i soje, voska, čokolade, i čaja (Davies i sur., 2017), (Yao i sur., 2004) rezultati istraživanja na staničnim kulturama i životinjskim modelima pokazuju da flavonoidi mogu izravno ukloniti reaktivne kisikove spojeve (ROS) (Miyake i sur., 2000), zaštititi i obnoviti antioksidacijske obrambene enzime kao što su superoksid-dismutaza, katalaza i glutation-peroksidaza (Wang i sur., 2014), te inhibirati enzime koji proizvode ROS, kao što je ksantin-oksidaza (Xia i sur., 2017), (Zakaryan i sur., 2017). Izoflavonoidi, kao što su fitoestrogeni,

pokazuju širok raspon hormonskih i nehormonskih aktivnosti na životinjskim modelima ili *in vitro* (Cassidy i sur., 2000). Na staničnoj razini, flavonoidi smanjuju aktivnost enzima uključenih u staničnu signalizaciju kao što ciklooksigenaze i lipoksigenaze (Leyva-López i sur., 2016), (Mlcek i sur., 2016), tirozin-kinaze (Akiyama i sur., 1987) i fosfolipaze (Lindahl i Tagesson, 1997).

Kad se promatraju organi i organski sustavi, opisuje se zaštitna uloga flavonoida u nizu oboljenja. Najčešće se navodi njihovo protuupalno djelovanje kod ateroskleroze (kardiovaskularne bolesti), neurodegenerativnih bolesti, bolesti kostiju, mišića i skeleta, pretilosti (Serafini i sur., 2010), (González-Gallego i sur., 2007), zatim hepatoprotektivno (Hernández-Aquino i Muriel, 2018), antitumorsko djelovanje (Sak, 2017), (Lall i sur., 2016), antialergijsko i antivirusno djelovanje (Xu i sur., 2017).

1.2.2 Francuski paradoks

Kardiovaskularne bolesti (KVB) glavni su uzrok bolesti i smrti u zapadnim zemljama, a kardiovaskularni lijekovi najčešće su korištena farmakoterapija (Testai i Calderone, 2017). Preventivno djelovanje flavonoida u kardiovaskularnim bolestima našlo se u fokusu znanstvenika nakon otkrića francuskog paradoksa (Knekt i sur., 1996), (Peterson i sur., 2012). Francuski paradoks jest termin predložen 1992. temeljem epidemioloških podataka za francusku populaciju prema kojima se prehrana s visokim unosom kolesterola i zasićenih masti, podudarala s niskom stopom pojavnosti i niskim rizikom od kardiovaskularnih bolesti uz pretpostavku da je u tome važnu ulogu imao zaštitni antitrombotski utjecaj vina (Renaud i Lorgeril, 1992) odnosno, u istraživanjima koja su uslijedila visok sadržaj polifenola resveratrola u vinu (Catalgol i sur., 2012), (Davies i sur., 2017). Epidemiološke studije pokazuju da umjerena konzumacija vina smanjuje smrtnost 20-30 %, pogotovo od kardiovaskularnih bolesti (Fernandes i sur., 2017). U prevenciji kardiovaskularnih bolesti sudjeluju i druge namirnice bogate flavonoidima. Jabuke i kruške, crno vino, jagode, mekinje (dodane hrani) i čokolada su značajno povezane s smanjenim rizikom od smrti od kardiovaskularnih bolesti prema Mink i sur., (2007). U istraživanju populacije sredovječnih japanskih žena i muškaraca, Kokubo i sur., (2007) otkrili su značajnu inverznu povezanost između unosa soje i izoflavona s rizikom od pojave moždanog udara i infarkta miokarda u žena ali ne i u muškarca. Meta-analiza Wang i sur., (2014) je pokazala da su unosi antocijanidina, proantocijanidina, flavona, flavanona i flavanola obrnuto povezan s rizikom od KVB-a.

1.2.3 Agregacija trombocita na mjestu ozlijede krvne žile

Nakon ozljede krvne žile, važno je u što kraćem vremenu zaustaviti krvarenje u tkivo stvaranjem tromba. Endotel krvne žile na mjestu ozlijede sadrži kolagen i von Wilebrandov faktor (VWF) iz Weibel–Paladeovih tjelešaca. Trombociti se usporavaju i izdvajaju iz krvnog protoka putem interakcija s VWF-om koji se veže na trombocitni glikoproteinski receptor GPIbα, dio kompleksa GPIb-IX-V.

Kolagen se veže na dva receptora, glikoproteinski receptor GPVI, koji je pripadnik superporodice imunoglobulina, te na integrin $\alpha_2\beta_1$, oba smještena na membrani trombocita. GPVI na sebi nosi molekulu za aktivaciju prijenosa signala tirozin-kinazom (ITAM) u sklopu citoplazmatske FcRγ domene (Moroi i Jung, 2004). Za aktivaciju molekule ITAM fosforilacijom, odgovorne su Src kinaze Fyn i Lyn također smještene na citoplazmatskom dijelu GPVI. ITAM zatim aktivira Syc tirozin-kinazu koja je odgovorna za aktivaciju fosfolipaze-Cγ_2 (PLCγ_2) preko kompleksa signalosoma (Li i sur., 2010). PLCγ_2 potiče stvaranje inozitol-1,4,5-trifosfata (IP_3) i diacilglicerola (DAG) hidrolizom iz fosfatidilinozitol-4,5-bifosfata (PIP_2). IP3 je odgovoran za povećanje koncentracije intracelularnog kalcija (Varga-Szabo i sur., 2009) a DAG za aktivaciju protein-kinaze C (PKC) važne za sekreciju granula, aktivaciju integrina i sintezu tromboksan A_2 (TXA_2) (Bye i sur., 2016).

Vezanjem kolagena na drugi receptor, integrin $\alpha_2\beta_1$, mijenja se konformacijski oblik integrina u aktivni oblik. Aktivni oblik integrina $\alpha_2\beta_1$ sinergistički djeluje uz GPVI te povećava svoj afinitet vezanja *in-side out* signalizacijom.

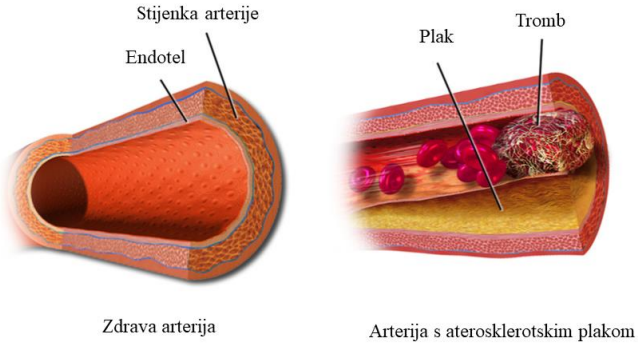
Osim kolagena, agonisti aktivacije djeluju putem membranskih receptora vezanih na transmembranske molekule G-proteina: $G\alpha_{i/o/z}$, $G\alpha_s$, $G\alpha_{q/11}$, and $G\alpha_{12/13}$ (Oldham i Hamm, 2008). $G\alpha_q$ je važan za agregaciju trombocita putem trombina, ADP-a, tromboksan A_2 (TXA_2), 5-hidroksitriptofana (5HT), faktora koji aktivira trombocite (engl. *platelet activating factor*, PAF), a neizravno i za agregaciju potaknutu kolagenom koji za optimalnu aktivaciju trombocita zahtijeva umnožavanje signala putem TXA_2 i ADP (Estevez i Du, 2017).

Agonisti aktivacije vežu se na više različitih receptorskih mjesta G-proteina koja djeluju sinergistički. Trombin se veže na proteinazom aktivirane receptore, PAR-1 i PAR-4 vezane na $G\alpha_q$ i $G\alpha_{13}$ (Coughlin, 2005). Iako je receptor za ADP, P2Y12, tipični predstavnik receptora vezanih za $G_{\alpha i}$ protein, za prijenos aktivacijskog signala putem ADP-a treba sinergističko djelovanje s P2Y1 receptor vezanim na $G\alpha_q$ (Offermanns, 2006). TXA_2 se veže na receptor TP vezan na $G\alpha_q$ i $G\alpha_{12/13}$ (Thomas i sur., 1998).

Prijenos signala putem G-proteinskog kompleksa također završava aktivacijom fosfolipaze C, ali njene β varijante (PLCβ) koja, kako je već opisano za PLCγ, vodi sintezi IP_3 i DAG i posljedično povećanju intracelularnog kalcija. Povećanje koncentracije Ca^{2+} vodi oslobađanju P-selektina, trombocitnog čimbenika 4 (engl. *Platlet Factor 4*, PF4), ADP, ATP, Ca^{2+} i serotonina iz gustih i α-granula. Sinteza TXA_2 regulirana je na razini oslobađanja arahidonske kiseline (AA) iz membrane djelovanjem fosfolipaze A_2 (PLA_2) koja se aktivira povećanjem koncentracije intracelularnog kalcija (Börsch-Haubold i sur., 1997). AA se putem enzima ciklooksigenaze-1 (COX-1) prevodi u TXA_2. TXA_2 uz čimbenike koji se otpuštaju iz gustih i α-granula pojačava početni aktivacijski signal tzv. *in-side out* signalizacijom čija je krajnja promjena aktivacija integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. On, konformacijskom promjenom svoje strukture, omogućuje visoko afinitetno vezanje fibrinogena i VWF (Bye i sur., 2016) te formiranje početnog sloja slijepljenih trombocita na mjestu ozljede. Taj primarni sloj trombocita omogućava formiranje kompleksa protrombinaze (aktivirani faktori zgrušavanja FXa i Va) i lokalizaciju koagulacije na mjestu ozlijede. Lokalna sinteza trombina vodi prelasku fibrina iz topivog u netopiv oblik i stvaranju čvrstog tromba koji sprječava daljnje krvarenje u tkivo te omogućuje zaraštavanje ozljede (Agbani i Poole, 2017).

1.2.4 Arterijska tromboza

Za razliku od opisanih procesa u uvjetima fiziološke hemostaze, na mjestu rupture aterosklerotskog plaka (slika 3) dolazi do vezanja površinskih receptora na trombocitima za subendotel što pokreće njihovu aktivaciju (Davì i Patrono, 2007). Ona je pojačana oslobađanjem i lokalnom akumulacijom topivih agonista trombocita (trombin, ADP, serotonin i TXA_2) što uzrokuje daljnju agregaciju trombocita, vazokonstrikciju arterija i smanjenje protoka krvi (Keihanian i sur., 2018). Opće je prihvaćeno da trombociti imaju ključnu ulogu u razvoju KVB-a (Bhatt i Topol, 2003). Nekontrolirana aktivacija trombocita dovodi do patogeneze prolazne ishemijske atake, nestabilne angine, infarkta miokarda i cerebrovaskularnih infarkta (Srivastava i Dash, 2001). Arterijska je tromboza uzrok infarkta miokarda (MI) i moždanog udara, a arterijski su trombi strukturno bogati trombocitima i formiraju se na stjenci krvne žile ili oko rupture aterosklerotskih plakova. Arterijska se tromboza javlja na mjestima visoke brzine protoka (Koupenova i sur., 2017). Hiperaktivnost trombocita povezana je s čimbenicima rizika za KVB (pušenje, dijabetes, hipertenzija i hiperkolesterolemija) (El Haouari i Rosado, 2009).



Slika 3. Zdrava arterija i arterija s aterosklerotskim plakom, preuzeto i prilagođeno (Blausen.com staff and staff, 2014)

1.2.5 Antiagregacijska terapija

Današnja terapija tromboze može se podijeliti na: 1) antikoagulante koji sprečavaju aktivaciju koagulacijske kaskade, 2) antitrombocitne lijekove koji smanjuju agregaciju trombocita i stvaranje tromba i 3) fibrinolitičke lijekove koji neposredno otapaju stvoreni ugrušak (Ringleb Peter A., 2006). Antiagregacijska terapija temelj je u liječenju arterijske tromboze a uključuje aspirin koji ireverzibilno inhibira aktivnost ciklooksigenaze-1 (COX-1) u trombocitima i time ometa sintezu arahidonske kiseline (AA), i proizvodnju TXA_2 (Patrono, 1994). Klopidogrel je prolijek antagonist receptora za ADP, P2Y12, i uz njegovu terapijsku primjenu vezana je mogućnost slabijeg ili izostanka odgovora na terapiju uslijed genskog polimorfizma enzima CYP2C19, koji sudjeluje u njegovoj pretvorbi u djelotvorni metabolit. Uz klopidogrel, isti mehanizam djelovanja posjeduje i prasugrel, koji ima manje metaboličkih koraka do nastanka aktivnog metabolita te tikagrelor koji ne treba bioaktivaciju za djelovanje (Angiolillo, 2012). Oni predstavljaju poboljšane terapijske opcije mehanizmom blokade P2Y12 receptora. Nove opcije liječenja predstavljaju i lijekovi inhibitori integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ kao i antagonisti receptora za trombin aktiviranih proteazom (PAR).

Najčešće neželjene reakcije antiagregacijske terapije jesu krvarenja u gastrointestinalnom traktu koja se nerijetko zbrinjavaju transfuzijom koncentrata trombocita (Gremmel i Panzer, 2017), (Montalescot i Sabatine, 2016). Antiagregacijska terapija intenzivno je farmakološko i kliničko područje gdje smjernice vezane uz terapiju arterijske ishemijske bolesti nastoje poboljšati trenutne manjkavosti, najčešće primjenom dvojne terapije koja uključuje dva različita mehanizma antiagregacijskog djelovanja (primjenjuju se aspirin i inhibitori P2Y12), (Wilson i sur., 2017).

1.2.6 Mehanizam antiagregacijskog djelovanja flavonoida

Kompleksnost procesa koji dovode do aktivacije i agregacije trombocita u uvjetima biološke hemostaze, a posebice u patološkim stanjima tromboze razlog su da danas još uvijek ne postoji adekvatna, učinkovita i neškodljiva antiagregacijska terapija. Iako se razvijaju poboljšani antiagregacijski lijekovi, njihov učinak na stopu morbiditeta i smrtnosti nije još precizno utvrđen (Davis i sur., 2013).

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) preporučila je učinkovitije korištenje ljekovitog bilja u zdravstvenom sustavu (Mohd Nor i sur., 2016). U sklopu prevencije kardiovaskularnih bolesti flavonoidi se istražuju i kao antiagregacijski spojevi. Flavonoidi pokazuju brojne biološke aktivnosti i time ostvaruju model višestrukog djelovanja koji danas koristi i najnoviji pristup u prevenciji i liječenju posljedica koronarne arterijske bolesti dvostrukom (aspirin i inhibitori P2Y12) i trostrukom antitrombocitnom terapijom (dvostruka uz oralne antikoagulante, OAK) (Golwala i sur., 2018). Međutim, mehanizam djelovanja većine flavonoida nije još razjašnjen (slika 4).

Brojna istraživanja temelje svoje rezultate na djelovanju ekstrakta različitih biljaka gdje se tek pretpostavlja njihov sastav flavonoida. Prema Chen i sur. (2015), spojevi iz prirode, koji pokazuju antiagregacijska svojstva, ostvaruju ih većinom temeljem inhibicije trombocitnih membranskih proteina koji na taj način utječu na sintezu nukleotida i AA kao i na sekreciju granula. Promatrajući učinke pojedinih flavonoida, REGARDS studija u SAD, na oko 20.000 ispitanika, ispitala je odnos unosa pojedinih vrsta flavonoida i pojavnost srčanog udara te dobila jedino za skupinu flavanona obrnutu povezanost koja nije bila uvjetovana spolom, rasom niti geografskim područjem (Goetz i sur., 2016). Ekstrakt Ginko bilobe, čija se aktivnost može pripisati djelovanju flavonoida, inhibira agregaciju induciranu ADP-om i kolagenom u ovisnosti o koncentraciji ekstrakta, te se nakon inkubacije trombocita s ekstraktom mjere snižene koncentracije TXA_2 i unutarstanične koncentracije Ca^{2+}, te povišena koncentracija cAMP (Dutta-Roy i sur., 1999). Ro i sur., (2015) su na pokusima sa štakorima dokazali djelovanje ekstrakta lupine luka, odnosno prvenstveno kvercetina, na smanjenje koncentracije TXA_2 putem smanjenja unutarstanične koncentracije Ca^{2+}, te aktivnosti PLC.

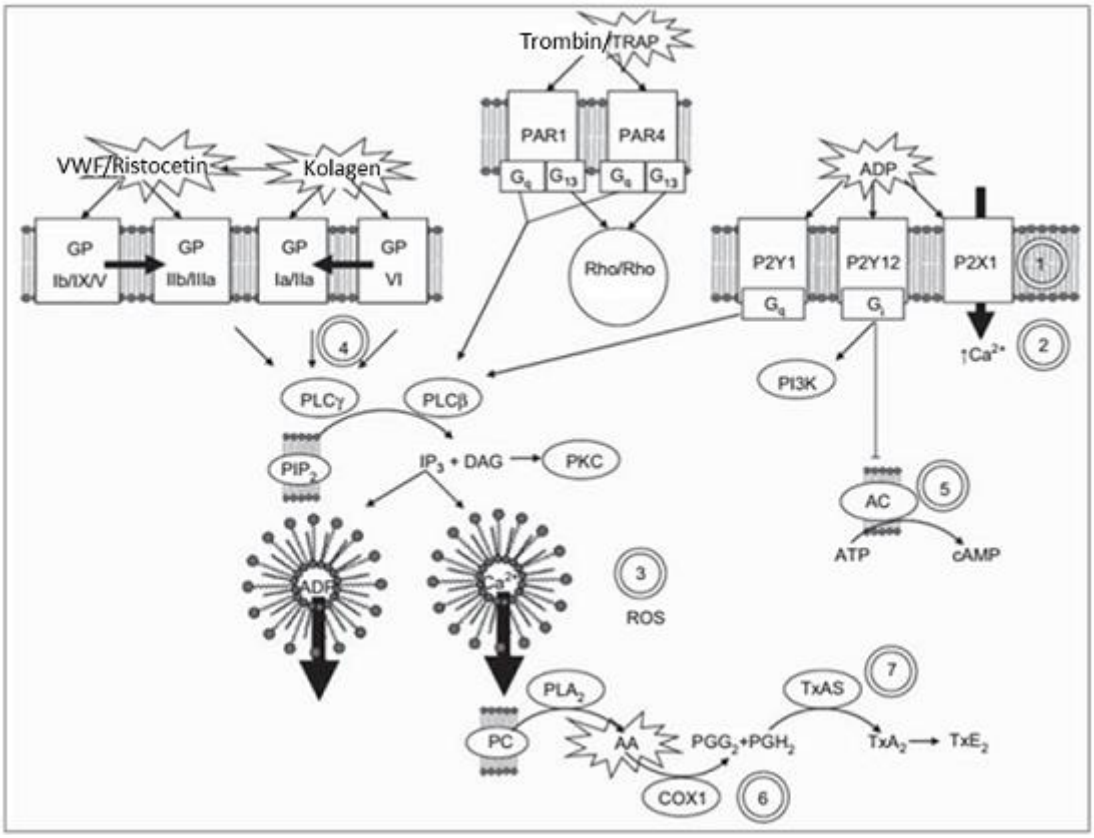
Učinak flavonoida ovisan je i o njihovoj strukturi. Ravishankar i sur. (2018) u svojem istraživanju uspoređuju učinak 16 strukturno srodnih hidroksi flavona, metoksi flavona i njihovih 4-tio analoga i zaključuju da su u slučaju iste strukture prstena B, hidroksi flavoni (sa slobodnim -OH skupinama) učinkovitiji od njihovih odgovarajućih metoksi flavona (s $-OCH_3$

skupinom) iako studija Bojić i sur. (2011) navodi povećanje antiagregacijskih potencijala *O*-metiliranih derivata u usporedbi s njihovim hidroksiliranim analozima.

Kada se govori o interakciji flavonoida s pojedinim enzimskim putovima u trombocitu, dosadašnja saznanja objedinjena su na slici 4. Čini se da je specifični temeljni mehanizam, uobičajen za većinu spojeva flavonoida, inhibicija agregacije djelovanjem na TXA_2 (Faggio i sur., 2017), (Mladěnka i sur., 2010) bilo kao antagonist TXA_2 (Guerrero i sur., 2005) ili inhibicijom enzima COX-1 (Corvazier i Maclouf, 1985). Tian i sur. (2016) ulogu flavonoida skutelareina kao potencijalnog inhibitora protein-kinaze C (PKC) potvrđuju analizom aktivnosti PKC metodom molekulskog sidrenja. Istraživanje Pignatelli i sur., (2000) na djelovanju kombinacije katehina i kvercetina na agregaciju, opažaju snažnu inhibiciju sinteze vodikovog peroksida, mobilizacije kalcija i stvaranja PI_3 te zaključuju da katehin i kvercetin zajedničkim djelovanjem ostvaruju inhibiciju PLC. Dobrydneva i sur. (1999) u nizu eksperimenata s otpuštanjem kalcija iz unutarstaničnih skladišta zaključuje da *trans*-resveratrol uzrokuje inhibiciju Ca^{2+}-kanala na membrani trombocita i na taj način ostvaruje antiagregacijski učinak. Današnja istraživanja flavonoida idu u smjeru postizanja višestruke učinkovitosti. Autori Stylos i sur. (2017) u svojem su eksperimentu modificirali molekulu naringenina u učinkovitiji derivat koji omogućuje trostruki učinak djelujući na putu aktivacije ADP-om, AA i TRAP-6.

Opisani su brojni utjecaji prirodnih spojeva na različite biološke sustave. Ta se sveobuhvatnost objašnjava i interakcijama s lipidima koji sačinjavaju biomembrane te se upravo interakcija s membranskim lipidima opisuje kao jedan od važnih mehanizama. Kemikalije biljnog podrijetla utječu na fizikalno-kemijska svojstva membrane (fluidnost, mikroviskoznost, elastičnost i propusnost) kao što utječu lijekovi s membranskim djelovanjem (Tsuchiya, 2015). Membrana trombocita ima posebnu važnost jer je osnova njihove funkcionalnosti te je promjena njene fluidnosti povezana s promjenama u agregaciji trombocita (Rao i White, 1985).

Eksperimenti na izoliranim trombocitima, plazmi bogatoj trombocitima (engl. *platelets rich plasma*, PRP) i punoj krvi potvrđuju antiagregacijske učinke, ali treba naglasiti da se većina podataka temelji na *in vitro* studijama dok je broj eksperimenata u ljudi ograničen (El Haouari i Rosado, 2016). U istraživanju procesa aktivacije trombocita, budući se radi o stanicama bez jezgre, najčešće se koriste modeli s inhibitorima pojedinih enzima ili receptora uključenih u prijenos signala prilikom aktivacije trombocita.



GP-glikoprotein, PAR-proteinazom aktivirani receptori, PLC-fosfolipaza C, PIP2 –fosfatidilinozitol bifosfat, IP3-inozitol trifosfat, DAG-diacilglicerol, PKC-protein kinaza C, ROS-reaktivnih kisikovi spojevi, PLA-fosfolipaza A, PC-protein kinaza, PI3K-fosfoinozitid 3 kinaza, AC-acetil kolin, ATP-adenozin trifosfat, cAMP ciklički adenozin monofosfat, COX-ciklooksigenaza, TxAS-tromboksan A sintetaza, AA-arahidonska kiselina, PGG-prostaglandin G

Slika 4. Opisani mehanizmi antiagregacijskog djelovanja flavonoida na pojednostavljenom prikazu signalizacijske kaskade u aktivaciji trombocita potaknutoj različitim agonistima agregacije: 1-promjene u funkcioniranju membrane, 2 i 3-smanjeno stvaranje ROS i oštećenje membrane, i smanjenje unutarstanične koncentracije Ca^{2+}, 4-inhibicija aktivnosti Syk, Fyn kinaze i PLCγ_2, 5-inhibicija cAMP fosfodiesteraze, 6- inhibicija COX-1, 7-inhibicija sinteze TXA_2 (Bojić i sur., 2012)

1.3 Određivanje lipofilnosti spojeva

1.3.1 Molekulski deskriptori lipofilnosti

Prema rječniku Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union for Pure and Applied Chemistry*, IUPAC), lipofilnost predstavlja afinitet molekule za lipofilno okruženje. Lipofilnost spoja uobičajeno se mjeri karakteristikama njegove distribucije u bifaznom sustavu, bilo da se radi o sustavu tekuće-tekuće (npr. *n*-oktanol:voda) ili kruto-tekuće (RP-HPLC ili RP-TLC) (Chemistry, 2019). Za procjenu biološke aktivnosti odnosno djelotvornosti neke molekule, lipofilnost predstavlja jednu od najvažnijih osobina, jer svojim afinitetom za lipofilni okoliš molekula olakšava transport kroz membrane u biološkom sustavu kao i stvaranje kompleksa s veznim mjestom receptora (Rutkowska *i sur.*, 2013).

Poznavanje lipofilnost potencijalnih lijekova pomaže u razumijevanju njihove apsorpcije, distribucije, metabolizma, ekskrecije (ADME) i toksičnosti (ADMET) (Lombardo i sur., 2000). Lipinski i sur. (2001) tvorci su pravila „*pet*“ koja predviđaju da je slaba apsorpcija ili prolazak kroz staničnu membranu vjerojatniji kod spojeva s više od 5 donora vodikovih veza, više od 10 akceptora vodikovih veza, ako je molekulska masa veća od 500 Da i ako je izračunati log*P* veći od 5, a odnosi se na spojeve koji se ne apsorbiraju aktivnim transportom. Prema pravilima, 3 od četiri zahtjeva moraju biti zadovoljena da bi spoj imao dobru bioraspoloživost oralnom primjenom.

Među pravila je uvrštena i lipofilnost molekule odnosno njena mjera - logaritam koeficijenta razdijeljenja P. Razdijeljenje nekog spoja mjeri se u stanju ravnoteže između dva otapala, vode i organske faze, najčešće *n*-oktanola, koji se ne miješaju. *n*-oktanol je standardno korišteno organsko otapalo jer najbolje oponaša prirodu bioloških membrana (Hansch i Fujita, 1964).

$$\log P = \log (C_{\text{oktanol}}/C_{\text{voda}}) \qquad (1)$$

Zlatni standard određivanja koeficijenta razdijeljenja je metoda izmućkavanja. Uključuje miješanje vodene otopine poznate koncentracije spoja s poznatim volumenom organske tvari. Kada se uspostavi ravnoteža, mjeri se (obično spektrofotometrijski) koncentracija spoja koja je zaostala u vodenoj fazi ili koncentracije spoja u organskoj fazi (Saghaie i Mostafavi, 2003). Metoda je dugotrajna i zahtjevna, traži veliki volumen uzorka, ima stroge zahtjeve za čistoćom uzorka, te uzak raspon mjernog područja (Rutkowska i sur.,

2013). Zbog mana metode izmućkavanja, danas se uobičajeno koeficijent razdijeljenja određuje metodom tankoslojne kromatografije obrnute faze, (engl. *reverse phase thin layer chromatography* RP-TLC) (Biagi i sur., 1975) / tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) (Kaliszan i sur., 2002), plinskom kromatografijom (Castells, 2004) i potenciometrijski (Barzanti i sur., 2007).

Tehnika RP-TLC definira kromatografski parametar R_M kao vrlo korisnu opisnicu lipofilnosti izvedenu pomoću čimbenika zadržavanja R_F.

$$R_F = a/b \qquad (2)$$

$$R_M = \log(1/R_F - 1) \qquad (3)$$

U izrazu za R_F, *a* predstavlja udaljenost ispitivane supstancije od mjesta nanošenja, a *b* udaljenost fronte smjese otapala koja se koriste za razvijanje kromatograma od mjesta nanošenja. Prednosti utvrđivanja parametra R_M RP-TLC metodom u odnosu na određivanje log*P* je brzina i ekonomičnost, preciznost, reproducibilnost metode, mogućnost nanošenja više spojeva odjednom, manja količina uzorka s nižim zahtjevima za čistoću jer se nečistoće mogu izdvojiti kromatografski. Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD) u svojim smjernicama za ispitivanje kemikalija ("Test No. 117," 2019) opisuje metodu za određivanje koeficijenta razdijeljenja ($\log P_{OW}$) primjenom RP-HPLC-a. Zbog svojih prednosti, u radovima se često RP-HPLC zamjenjuje RP-TLC metodom zadržavajući iste principe opisane u smjernicama OECD-a, RP-18 silika stacionarne faze i sastav mobilne faze koje omogućuje najveću selektivnost (Rabtti i sur., 2012).

Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) (Leo *i sur.*, 1971) modeliranje razvilo se na modelu *Structure-Activity Relationships* (SAR) čija je osnova analize da kemijska i fizička svojstva molekula određuju i njihovo biološko, toksikološko i fizikalno ponašanje u kontaktu s biološkim sustavom (McKinney i sur., 2000). QSAR modeliranje je stvaranje matematičkog odnosa opisnica molekulske strukture i aktivnosti molekule (Gandhi i Morris, 2009). Prilikom izrade teoretskih izračuna vodi se premisom da se kemijski srodne, slične, molekule isto ponašaju.

Jedan od često primjenjivanih QSPR modela (kvantitativni odnos struktura i fizikalno kemijskih svojstava) je predviđanje log*P* vrijednosti. Kreirana je obimna baza eksperimentalnih log*P* za stotine različitih osnovnih molekula. Njome se nastojalo što točnije odrediti parametre modeliranja dodavanjem podataka o fragmentima molekula za fragmentarni pristup određivanja log*P*. Iz toga je prvo razvijen CLOGP program (Leo i sur., 1975). Daljnji razvoj baza vodio je stvaranje računalnih programa za izračun (predviđanje) lipofilnosti (log*P*) kemijskih spojeva, temeljenih na skupu predefiniranih atoma, fragmenata i njihovog doprinosa (Kłosińska-Szmurło i sur., 2014), (Bennion i sur., 2017) (Daina i sur., 2017).

1.3.2 Interakcija flavonoida s biomembranama

Ciljna mjesta djelovanja lijekova dobivenih iz biljaka nalaze se na različitim mjestima u stanicama ljudskog tijela. Oni mogu djelovati na razini različitih bioloških membrana, kao i unutar odjeljaka ograničenih membranama (Hendrich, 2006). Studije koje se bave mehanizmom djelovanja flavonoida istražuju njihov smještaj unutar stanice kao dio objašnjenja širokog spektra djelovanja, a amfipatski karakter potaknulo je brojna istraživanja interakcija flavonoida s biomembranama. U radu s izoflavonima i njihovim prenilnim derivatima autori zaključuju da lipofilniji izoflavoni s prenilnim supstitucijama nalaze svoj smještaj dublje u membrani dok se oni hidrofilniji smještaju na granici membrane te da njihova biološka aktivnost ovisi upravo o interakciji onih lipofilnijih smještenih u jezgri lipidnog dvosloja (Hendrich i sur., 2002). Tammela i sur. (2004) promatrali su propusnost jednoslojne membrane *Caco-2* stanica nakon interakcije s flavonoidima i zaključili da hidroksilacija i planarnost molekula flavonoida vodi jačoj interakciji s jednoslojnom membranom i smanjuje njihov ulazak u stanice, dok hidrofobniji flavonoidi, kao flavon, ulaze u *Caco-2* stanice pasivnom difuzijom. Ollila i sur. (2002) su u svom eksperimentu HPLC metodom na 8 različitih flavonoida povezali veću retenciju flavonoida s više hidroksilnih skupina sa stacionarnom fazom obloženom 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfokolinom. U pokusu na jednolamelarnim vezikulama s kalceinom, veću nestabilnost i izlazak kalceina iz vezikula, izazivali su lipofilniji flavonoidi.

2 CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Kardiovaskularne bolesti vodeći su uzrok morbiditeta i mortaliteta u zemljama razvijenog svijeta. Prevencija kardiovaskularnih bolesti uključuje promjenu životnih navika u prehrani i tjelovježbu. No, ukoliko to nije dovoljno uvodi se standardizirana terapija, a nerijetko i operacijski zahvati. Mnogostrukost čimbenika koji vode razvoju KVB-a i njihova interakcija izazov je za odabir učinkovitog terapijskog pristupa. Nastanak tromba na mjestu rupture aterosklerotskog plaka predstavlja neposrednu opasnost zbog smanjenog protoka kroz krvnu žilu i razvoja akutnog koronarnog sindroma ili akutne cerebrovaskularne bolesti. U terapijskom pristupu KVB-u prisutni su, među ostalim, antikoagulacijski i antiagregacijskih lijekovi. Kompleksnost bioloških mehanizama aktivacije i agregacije trombocita nameće koncept antiagregacijske terapije djelovanjem na više ciljnih molekula, te je danas dokazano da je terapija dvama antiagregacijskim lijekovima uspješnija od kombinacije antiagregacijskog i antikoagulacijskog lijeka. Klasična antiagregacijska terapija opterećena je manjkavom djelotvornošću i ozbiljnim neželjenim učincima, kao što su krvarenja, najčešće u gastrointestinalni trakt, a iznimno rijetko i ali i puno opasnije, intrakranijalno. Stoga je iznalaženje učinkovite, a manje škodljive antiagregacijske terapije jedan od izazova farmaceutske industrije.

Flavonoidi su biljni spojevi zastupljeni u svakodnevnoj prehrani, kao sastojci voća, povrća, sjemenki, napitaka. Otkrićem francuskog paradoksa devedesetih godina prošlog stoljeća, polifenolni spojevi, a među njima i flavonoidi predstavljeni su kao sastojci prehrane s preventivnim učinkom na pojavnost KVB-a. Osnova tog blagotvornog učinka flavonoida prvenstveno je njihovo protuupalno i antiagregacijsko djelovanje, a u brojnim istraživanjima koja su uslijedila opisuju se i druga značajna djelovanja kao što su protutumorsko, protuvirusno i protualergijsko djelovanje. Antiagregacijsko djelovanje flavonoida je sveobuhvatno. Opisane su interakcije flavonoida s enzimima ciklooksigenazom, lipoksigenazom, tirozin-kinazom, fosfolipazom koje sudjeluju u procesima aktivacije i agregacije trombocita. No mehanizmom za većinu flavonoida nije jasno objašnjen.

Za bioaktivnost spojeva od izuzetne je važnosti njihova lipofilnost koja im omogućuje difuziju u stanice kroz lipidni dvosloj bioloških membrana. Tako je pri procjeni učinkovitosti novih lijekova procjena lipofilnosti nezaobilazan dio QSAR i QSPR modeliranja. Očekuje se da se flavonoidi temeljem svoje strukture smještaju u lipidni medij, te da to svojstvo pretpostavlja dobar preduvjet za njihovu opisanu biološku aktivnost.

Hipoteza ovog istraživanja pretpostavlja da se sveobuhvatnost antiagregacijskog djelovanja flavonoida temelji na tendenciji njihovog smještanja u lipidni dvosloj membrane trombocita zbog svoje lipofilnosti. Takvim smještanjem oni smanjuju fluidnost membrane što za posljedicu ima smanjenu ekspresiju aktivnog oblika receptora integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, odnosno smanjenje aktivacije i agregacije trombocita. Ovaj mehanizam predstavlja osnovu antiagregacijskog djelovanja svim flavonoidima.

Specifični ciljevi ovog rada su:

1. ispitati mogućnost interakcije flavonoida s membranom
   a. utvrđivanjem lipofilnost flavonoida temeljem njihovih logaritamskih vrijednosti koeficijenta razdijeljenja (log*P*),
   b. utvrđivanjem ekspresije aktivnog oblika integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ prije i nakon djelovanja flavonoida;
2. ispitati sveobuhvatnost djelovanja flavonoida na aktivaciju trombocita u prisustvu specifičnih inhibitora za enzime PLC, COX-1 i inhibitora kalcijevih kanala uz različite agoniste agregacije;
3. ispitati zajednički učinak kombinacije različitih i istih grupa flavonoida uz različite agoniste agregacije trombocita.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci krvi

U istraživanje je bilo uključeno 105 dobrovoljnih davatelja krvi (DDK) Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM). Ispitanici su dali pisani, informirani pristanak prije sudjelovanja u istraživanju kojim su potvrdili da su pročitali obavijest za ispitanika, da shvaćaju svoj doprinos istraživanju i da nisu na antiagregacijskoj terapiji. Po jedan uzorak krvi svakog ispitanika prikupljen je u epruvete s podtlakom (4,5 mL) s trinatrijevim-citratom (3,2 %) kao antikoagulantom. Studija je provedena prema Helsinškoj deklaraciji i uz odobrenje Etičkog povjerenstva Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prilikom obrade rezultata poštivana su pravila Uredbe (EU) 2016/679 Europskog parlamenta i Vijeća od 27. travnja 2016. o zaštiti pojedinaca u vezi s obradom osobnih podataka i o slobodnom kretanju takvih podataka te o stavljanju izvan snage Direktive 95/46/EZ (Opća uredba o zaštiti podataka).

3.1.2 Ploče za tankoslojnu kromatografiju, flavonoidi

Za kromatografsko razdvajanje flavonoida korištene su ploče RP-18 F254S HX731629 (Merck, SAD) s mobilnom fazom: acetonitril: voda: ledena octena kiselina (Kemig, Hrvatska).

Flavonoidi u obliku aglikona korišteni u ovom radu navedeni su u tablici 1.

Tablica 1. Aglikoni flavonoida i njihovi proizvođači

	Flavonoid	Proizvođač
	Flavoni	
1	Flavon	Fluka, Njemačka
2	6-hidroksiflavon	ChromaDex, SAD
3	7-hidroksiflavon	ChromaDex, SAD
4	Tangeretin	BioChemika, Švicarska
5	Tektokrizin	Extrasynthese, Francuska
6	Krizin-dimetileter	Extrasynthese, Francuska
7	Krizin	Fluka, Njemačka
8	Akacetin	BioChemika, Švicarska
9	Diosmetin	Extrasynthese, Francuska
10	Apigenin	Fluka, Njemačka
11	Luteolin	Extrasynthese, Francuska
	Flavonoli	
12	3,6-dihidroksiflavon	ChromaDex, SAD
13	3,7-dihidroksiflavon	ChromaDex, SAD
14	Galangin	Sigma-Aldrich, Švicarska
15	Ramnetin	BioChemika, Švicarska
16	Izoramnetin	BioChemika, Švicarska
17	Kvercetin*	Sigma-Aldrich, Švicarska
	Flavononi	
18	Pinocembrin-7-metileter	Extrasynthese, Francuska
19	Pinocembrin	Extrasynthese, Francuska
20	Hesperetin	Sigma-Aldrich, Švicarska
21	Flavanon	Sigma-Aldrich, Švicarska

*u obliku kvercetin-dihidrata

Standardi flavonoida pripremljeni su u 1/2n razrjeđenju u dimetil-sulfoksidu (DMSO, Sigma-Aldrich, Švicarska) u rasponu koncentracija od 488 mM do 62 nM.

3.1.3 Agonisti impedancijske agregometrije

Agonisti za impedancijsku agregometriju: adenozin-difosfat (ADP), kolagen, TRAP-6 (engl. *thrombin receptor activator peptide 6*), arahidonska kiselina (AA) i ristocetin nabavljeni su od tvrtke Roche Diagnostics (Njemačka), a fiziološka otopina s kalcijevim-kloridom (0,9 % NaCl s 0,003 M $CaCl_2$) iz HZTM (Hrvatska). Indometacin koji je inhibitor ciklooksigenaze (COX) i verapamil koji je blokator kalcijevih kanala, nabavljeni su od Acros Organics (Thermo

Fisher Scientific, Belgija), a inhibitor fosfolipaze C (PLC), U-73122, od Sigma Aldrich (Švicarska).

3.1.4 Fluorescentna antitijela za protočnu citometriju, plazma bogata trombocitima

Broj trombocita u plazmi bogatoj trombocitima (engl. *platelet rich plasma, PRP*) određen je na hematološkom brojaču ADVIA (Siemmens, Njemačka). PBS, pH 7,4 (engl. *phosphate buffered saline*, fosfatno puferirana fiziološka otopina) pripremljen u HZTM korišten je za podešavanje broja trombocita prije ispitivanja na protočnom citometru. Anti-integrinsko $\alpha_{IIb}\beta_3$ protutijelo (PAC-1) obilježeno fluorescein-izotiocijanatom (FITC) za praćenje aktivnog oblika trombocitnog receptora za fibrinogen, anti-CD61 obilježeno fikoeritrinom (PE) za obilježavanje populacije trombocita, izotipske kontrole za praćenje pozadinskog signala, mišji IgM, k izotip označen FITC-om i mišji IgG1, k izotip, označen PE-om kupljeni su od Becton Dickinson (SAD): Analiza trombocita protočnom citometrijom prevedena su na uređaju FC500, Beckman Coulter (Francuska).

3.2 Metode

3.2.1 Obrnuto fazna tankoslojna kromatografija

Dvadeset i jedan flavonoid analiziran je tankoslojnom kromatografijom obrnutih faza (RP-TLC). Na staklenoj ploči presvučenoj s silika-gelom modificiranim s alifatskim ugljikovodicima RP-18 povećava se moć razdvajanja ovisno o duljini alifatskog lanca čime se utječe na zadržavanje nanesenih spojeva ovisno o sastavu mobilne faze i udjelu vode. Modificirani silika gel je presvučen fluorescentnim indikatorom F254s. Korištena je mobilna faza sastava: acetonitril : voda : ledena octena kiselina u omjeru 66:33:1 (v/v/v). Mrlje su detektirane temeljem gašenja fluorescencije indikatora pod UV svijetlom na 254 nm. Vrijednosti čimbenika zadržavanja R_F za svaki flavonoid izračunate su prema formuli:

$$R_F = a/b$$

gdje je *a* udaljenost spoja od starta, a *b* udaljenost otapala od starta.

Temeljem eksperimentalnih vrijednosti R_F izračunate su vrijednosti hidrofobnog parametra iz tankoslojne kromatografije R_M prema formuli (Bate-Smith i Westall, 1950):

$$R_M = \log (1 / R_F - 1).$$

3.2.2 Izračun teoretskog log*P*

Izračun teoretskog koeficijenta razdijeljenja (log*P*) za spojeve iz tablice 1. proveden je pomoću dostupnih internetskih aplikacija *Chemicalize*, *ChemSketch*, *Molinspiration* i *SwissADME*. Aplikacija *Chemicalize* (c)log*P* koja se koristi s Chemaxon/Chemicalize poslužitelja temelji se na bazi unaprijed definiranih fragmenata uz nekoliko prilagodbi. *ChemSketch* program konstrukcijskim pristupom koristi vrijednosti osnovnih fragmenata spojeva dobivenih iz izmjerenih log*P* jednostavnih molekula, te uz to konstruira ostatak fragmenta (Kujawski i sur., 2012). Metoda *Molinspiration* (miLog*P*) za predviđanje log*P* je temeljena na doprinosima fragmenata koji su dobiveni unosom više od 12.000 molekula nalik lijekovima s eksperimentalnim log*P* podacima te se rezultat dobiva kao zbroj doprinosa fragmenata uz faktor korekcije (Bennion i sur., 2017). *SwissADME* izračunava log*P* na pet različitih načina i izražava njihovu konsenzus log*P* vrijednost: XLOGP3 koristi atomsku

metodu koja obuhvaća korekcijske faktore i knjižnice znanja, WLOGP predstavlja originalnu implementaciju čiste atomske metode bazirane na fragmentarnom sustavu, MLOGP je preteča topološke metode koja ovisi o linearnoj povezanosti sa 13 implementiranih deskriptora, SILICOS-IT je hibridna metoda koja je vezana uz 27 fragmenata i 7 topoloških deskriptora i iLOGP koju je SwissADME sam razvio i koja ovisi o slobodnoj energiji otapanja u *n*-oktanolu i vodi izračunatoj prema modelu engl. *Generalized-Born and solvent accessible surface area* (GB/SA) (Daina i sur., 2017).

3.2.3 Utvrđivanje odnosa eksperimentalnih i računalnih parametara lipofilnosti

Procjena uspješnosti programa *Chemicalize*, *ChemSketch*, *Molinspiration* i *SwissADME* u teoretskom određivanju lipofilnosti spojeva provedena je određivanjem koeficijenta korelacije za R_M i log*P* vrijednosti flavonoida iz Tablice 1. Korelacija je ispitivana za grupu od 21 flavonoida s pojedinačnim rezultatima za svaku programsku aplikaciju zasebno.

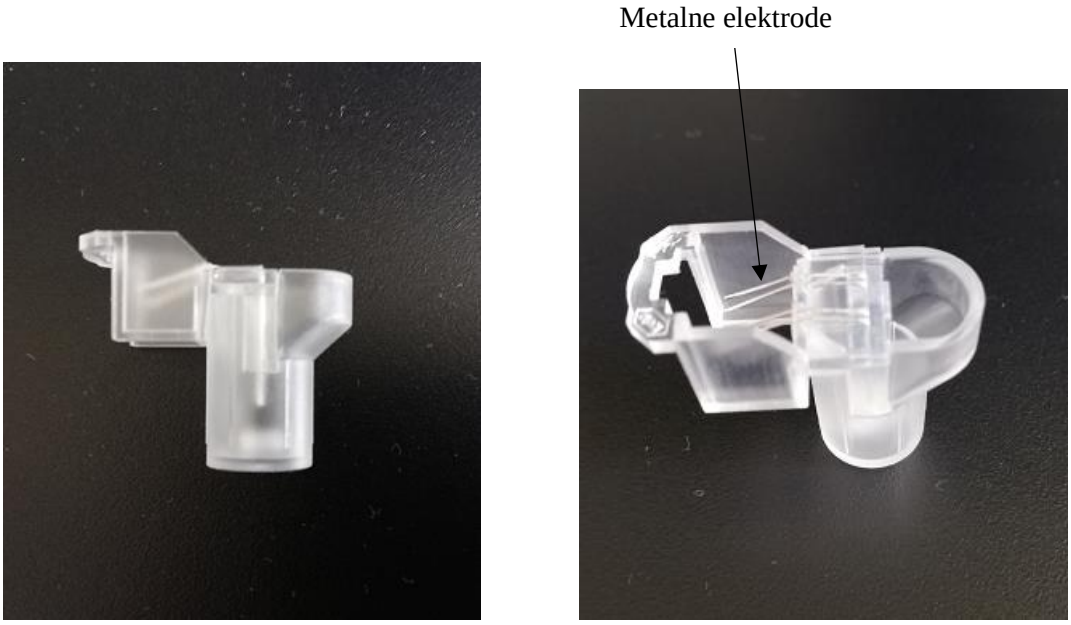
3.2.4 Utvrđivanje odnosa parametara lipofilnosti i *MINaAC*

Procjena povezanosti teoretski predviđene lipofilnosti s eksperimentalno određenim vrijednostima *MINaAC* za flavonoide iz tablice 1 provedena je određivanjem koeficijenta korelacije. Korelacija je ispitivana za grupu od 21 flavonoida s pojedinačnim rezultatima za log*P* za svaku programsku aplikaciju zasebno, za sve flavonoide i klase flavonoida. Vrijednosti *MINaAC* uz agonist ADP za sve flavonoide osim flavanona preuzete su iz rada Bojić i sur. (2011).

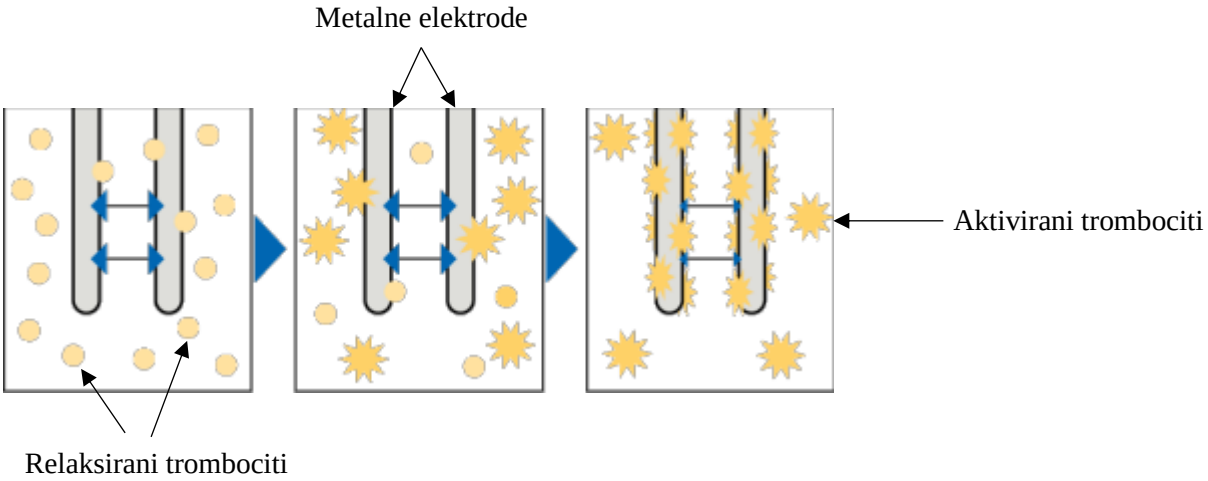
3.2.5 Impedancijska agregometrija

Impedancijska agregometrija prvi put je opisana u metodi Cardinal i Flower, (1980) i od tad se koristi za procjenu funkcije trombocita u punoj krvi kao njihovom fiziološkom okruženju. Pretpostavka je ove metode da trombociti nisu trombogeni u svom relaksiranom obliku, ali aktivirani izlažu receptore na svojoj površini kojima se vežu na vaskularna oštećenja i umjetne površine (Cardinal i Flower, 1980). Reakcija Multiplate® metode (Roche Diagnostics, Njemačka) odvija se na uređaju u jednokratnim ispitnim kivetama s dvostrukom senzorskom jedinicom uz miješanje magnetom obloženim teflonom (slika 5), na temperaturi

od 37 °C. Načelo metode je agregacija trombocita na metalnim elektrodama nakon aktivacije. Elektrode su izrađene od visoko vodljivog bakra, obloženog srebrom. Prianjanje aktiviranih trombocita na elektrode stvara električni otpor čije se povećanje kontinuirano mjeri (slika 6).

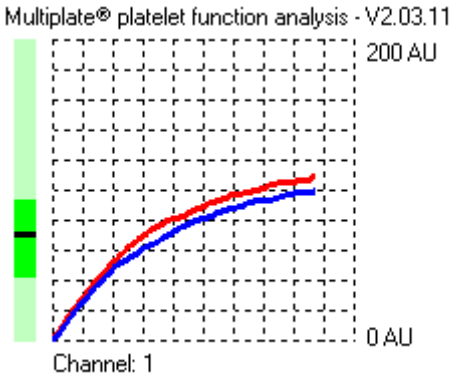


Slika 5. Ispitne kivete Multiplate uređaja (HZTM, Odjel za trombocitnu i leukocitnu dijagnostiku i hemostazu)



Slika 6. Načelo impedancijske agregometrije: nakon aktivacije trombociti se lijepe na metalne elektrode što vodi povećanju električnog otpora (uputstva za upotrebu uređaja Multiplate, HZTM, Odjel za trombocitnu i leukocitnu dijagnostiku i hemostazu)

Promjena impedancije mjeri se u arbitrarnim jedinicama (*AU*), a grafički je prikazana kao površina ispod krivulje (AUC) (slika 7).



Slika 7. Povećanje električnog otpora tijekom vremena prikazano kao površina ispod krivulje u *AU* (arbitrarne jedinice) (rezultati autorice)

Metoda koristi dva para elektroda kako bi mjerenje bilo točnije. Pearsonov koeficijent korelacije izračunava se za rezultate prikupljene s oba senzora te ako je koeficijent korelacije niži od 0,98 softver upozorava na lošiju kvalitetu rezultata i nudi odbacivanje rezultata isto kao i u slučaju da se AUC vrijednosti razlikuju više od 20 %. Uzorci krvi su analizirani unutar 3 sata od vađenja. Multiplate uređaj u rutinskom radu prikazan je na slici 8.

Slika 8. Multiplate uređaj u rutinskom radu (HZTM, Odjel za trombocitnu i leukocitnu dijagnostiku i hemostazu)

3.2.5.1 Određivanje *MINaAC* flavanona

Minimalna antiagregacijska koncentracija (*MINaAC*) flavanona određena je u prisutnosti agonista TRAP-6, ADP, kolagena, AA i ristocetina prema metodi Bojić i sur., (2011). Tom metodom ispitivao se stupanj agregacije nakon djelovanja niza koncentracijskih standarda flavanona (488-0,062 μM) u odnosu na rezultate agregacije za uzorak negativne kontrole, tretiran samo otapalom (DMSO). U tu svrhu koristio se originalni Multiplate® protokol za utvrđivanje neosjetljivosti trombocita na terapiju acetil salicilnom kiselinom, uz agonist arahidonsku kiselinu; ASPI-ASA test. Prema analogiji djelovanja umjesto acetilsalicilne kiseline, u uzorak pune krvi dodaje se flavonoid koji se ispituje, a osim AA kao agonist dodavani su i TRAP-6, ADP, kolagen i ristocetin.

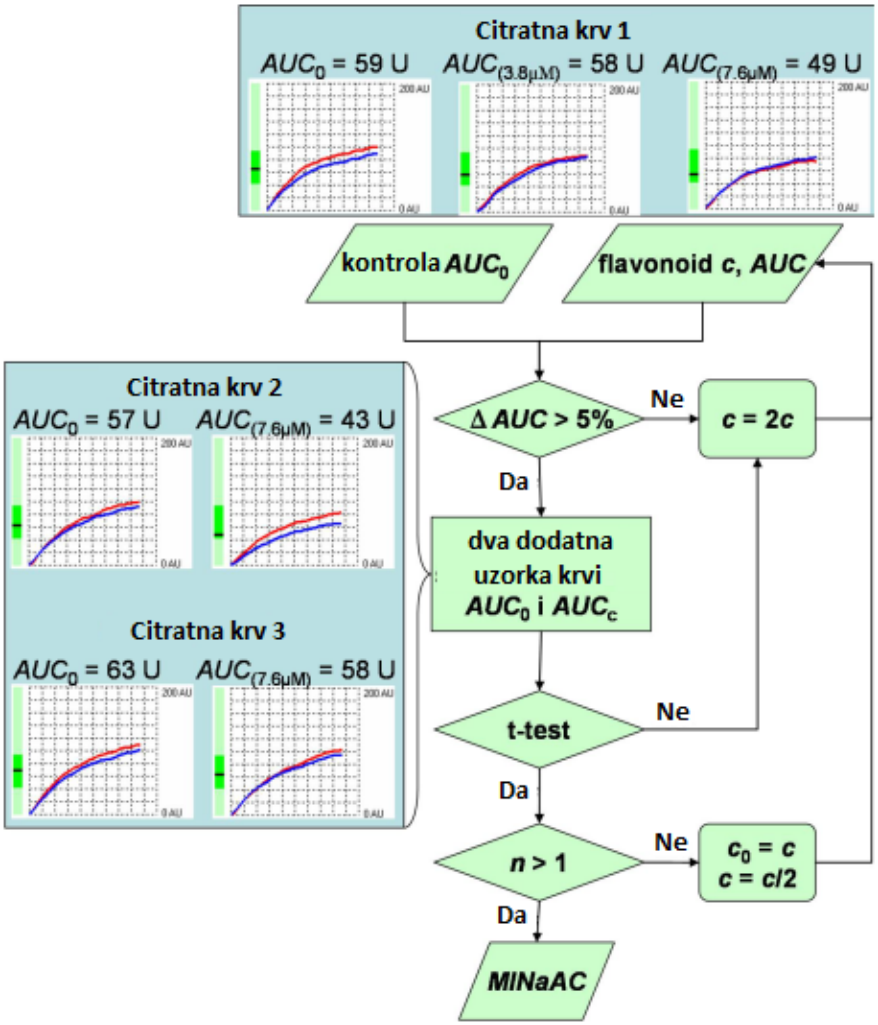
Protokol je opisan u tablici 2.

Tablica 2. Protokol za ASPI-ASA test Multiplate®-flavanon *MINaAC*

ASPI-ASA test Multiplate®	
fiziološka otopina s kalcijevim-kloridom (0,9% NaCl s 0,003 M $CaCl_2$) prethodno zagrijana na 37 °C	300 μL
R1*	20 μL
Uzorak pune krvi (18-25 °C)	300 μL
Inkubacija	180 s
Agonist**	20 μL
Mjerenje agregacije	6 min

*flavanon (konačna koncentracija 488-0,06 μM), DMSO (konačna koncentracija 3 %)
** Konačne koncentracije: 6,3 μM ADP, 3,1 μg/mL kolagena, 31 μM TRAP-6, 0,48 μM AA, 0,3 mg/mL ristocetina

Nakon dodatka agonista Multiplate® uređaj bilježi rast impedancije tijekom 6 minuta u obliku površine ispod krivulje izražene u *AU* jedinicama. *MINaAC* je određena kao statistički značajna razlika rezultata mjerenja u tri neovisna uzorka; za uzorak s flavanonom i uzorak s DMSO (negativna kontrola), prema grafičkom prikazu na slici 9.



Slika 9. Opis postupka. Izmjerena je agregacija uzorka s otapalom, DMSO (AUC0) i s flavonoidom (AUC1) Ukoliko je razlika rezultata agregacije bila veća od 5% mjerila se agregacija za još dva neovisna uzorka. U slučaju da je razlika rezultata agregacije bila <5% u ponovljeni postupak se uzimala dvostruko veća koncentracija flavonoida od početne. Kada se dobije statistički značajno (t-test) smanjenje agregacije za promatranu koncentraciju u usporedbi s rezultatima agregacije za uzorak s DMSO, promatrana koncentracija smatra se minimalnom antiagregacijskom koncentracijom (*MINaAC)*. Crvena i plava linija na grafu predstavljaju dva usporedna mjerenja u istom uzorku. Ukoliko je otklon između dva mjerenja veći od 20% pojavljuje se upozorenje o lošijoj kvaliteti mjerenja i mjerenje se treba ponoviti (Bojić i sur., 2011).

3.2.5.2 Ispitivanje utjecaja kombinacija lijekova i flavonoida na *MINaAC*

Ispitivanje agregacije nakon djelovanja flavanona i inhibitornih supstanci U-73122, indometacina te verapamila provodilo se uz manju izmjenu u volumenu R1 (flavanon, DMSO, inhibitorni spojevi) prema protokolu u Tablici 3.

Tablica 3. Protokol za ASPI-ASA test Multiplate®-zajedničko djelovanje flavanona i inhibitora agregacije

ASPI-ASA test Multiplate®	
fiziološka otopina s kalcijevim-kloridom (0,9 % NaCl s 0,003 M $CaCl_2$) prethodno zagrijana na 37 °C	300 µL
R1*	5 µL
0,9 % NaCl	15 µL
Uzorak pune krvi (18-25 °C)	300 µL
Inkubacija	180 s
Agonist	20 µL
Mjerenje agregacije	6 min

*flavanon, DMSO, U731229, indometacin, verapamil, konačna koncentracija DMSO 0,8 %
** Konačne koncentracije: 6,3 µM ADP, 31 µM TRAP-6

Smanjenjem volumena R1 postignuta je konačna koncentraciju otapala DMSO od 0,8 % koja nije utjecala na agregaciju trombocita u reakcijama sa spojevima inhibitorima. Antiagregacijsko djelovanje flavanona i inhibitora u prisustvu različitih agonista agregacije; TRAP-6 kao jakog agonista i ADP-a kao slabog agonista ispitano je u kombinacijama navedenim u tablici 4.

Tablica 4. Koncentracija spojeva korištenih u ispitivanju zajedničkog učinka flavanona i U731229, indometacina i verapamila na agregaciju trombocita

Agonist	**flavanon (µM)**	**Inhibitor (µM)**		
		U73122	verapamil	indometacin
TRAP-6 (30 µM)	30,00	4,00	82,50	0,21
ADP (6,3 µM)	3,80	3,20	52,00	0,21
AA (0,48 µM)	8,00	-	-	0,21
Kolagen (3,1 µg/mL)	7,50	0,40	-	-

Kako bi se postigla očita i ponovljiva inhibicija agregacije, u eksperimentima je za flavanon korištena 15 puta viša *MINaAC* u kombinaciji s TRAP-6 i 60 puta viša *MINaAC* u kombinaciji s ADP-om kao agonistom. Inhibitori enzima PLC-a, COX-1 i kalcijevih kanala primijenjeni su u koncentracijama prema literaturnim izvorima (Brocchieri i sur., 1995), (Heemskerk i sur., 1997), (Saeed i sur., 2004). Razlika rezultata agregacije za negativnu

kontrolu (DMSO 0,8 %), za uzorak tretiran s flavanonom ili inhibitorom signalnih putova te za uzorak inkubiran s kombinacijom flavanona i inhibitora testirana je na značaj uz razinu 0,05. Statistički značajna razlika između rezultata za negativnu kontrolu (DMSO), za rezultate samostalnog djelovanja flavanona i inhibitora teza uzorak inkubiran s kombinacijom flavanona i inhibitora smatrana je dokazom sinergističkog djelovanja.

Mjerenja su provedena na uzorcima minimalno 5 ispitanika.

3.2.5.3 Ispitivanje djelovanja kombinacije dva flavonoida na agregaciju trombocita

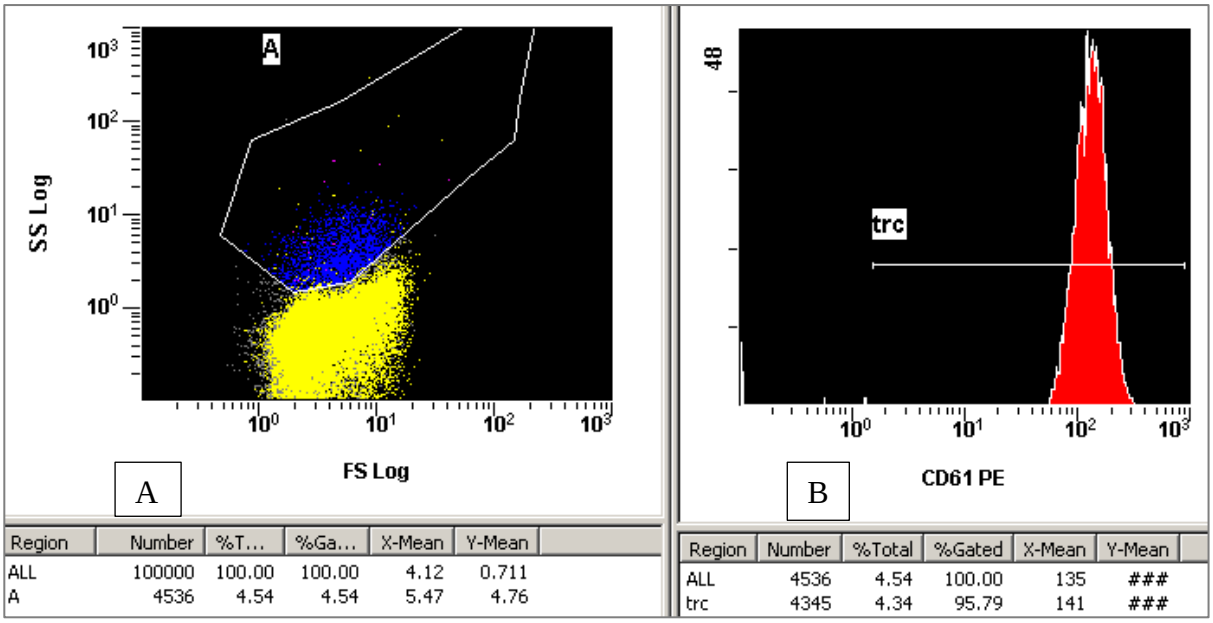
Ispitivanje agregacije nakon djelovanja kombinacije dva flavonoida provodilo se prema protokolu u Tablici 3. Promatrano je djelovanje flavanona u kombinaciji s pinocembrin-7-metileterom, kao predstavnikom flavonoida koji su prethodno u radu Bojić i sur., (2011) pokazali proagregacijsko djelovanje u agregaciji s AA i u kombinaciji s 6-hidroksiflavonom koji je jedini od promatranih flavonoida u istom radu pokazao antiagregacijsko djelovanje s AA kao agonistom agregacije. Korišteni su sljedeći agonisti agregacije: ADP, TRAP-6, kolagen i AA. Konačne koncentracije agonista navedene su u tablici 5. Primijenjene su *MINaAC* odabranih flavonoida prema radu Bojić i sur., (2012), te je promatrana značajnost razlike za grupu mjerenja nakon inkubacije s DMSO, flavanonom, pinocembrin-7-metileterom ili 6-hidroksiflavonom i nakon inkubacije s kombinacijom flavanona s pinocembrin-7-metileterom ili 6-hidroksiflavonom, te 6-hidroksiflavona s pinocembrin-7-metileterom, uz razinu značajnosti od 0,05. Statistički značajna razlika između rezultata agregacije za negativnu kontrolu (DMSO), za rezultate samostalnog djelovanja pojedinog flavonoida te za uzorak inkubiran s kombinacijom dva flavonoida smatrana je dokazom zajedničkog puta djelovanja. Mjerenja su provedena na uzorcima minimalno 4 ispitanika.

Tablica 5. Koncentracije flavanona, 6-hidroksiflavona i pinocembrin-7-metiletera i agonista TRAP-6, ADP, kolagena i AA u eksperimentima pojačanog djelovanja kombinacije flavonoida na agregaciju trombocita

	Agonist (μM)			
	TRAP-6 (30 μM)	ADP (6,3 μM)	kolagen (31 μM)	AA (0,48 μM)
Flavonoid	**MINaAC (μM)**			
flavanon	2,000	0,063	0,500	0,500
6-hidroksiflavon	61,040	0,950	122,070	7,630
pinocembein-7-metileter	30,520	0,950	61,040	7,630

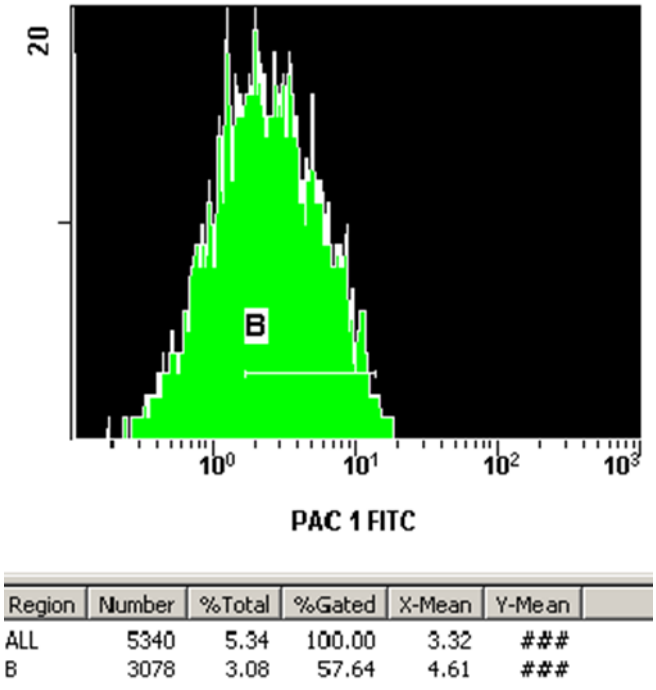
3.2.5.4 Praćenje aktivacije trombocita metodom protočne citometrije s fluorescentno označenim protutijelima

Mjerenja metodom protočne citometrije provedena su na uzorcima PRP-a. PRP je izdvojen centrifugiranjem uzoraka krvi unutar pola sata od vađenja, pri uvjetima 150 g, 10 min bez kočnice. Nakon brojanja trombocita koncentracija je podešena na $20x10^9$ trombocita/L s PBS-om (pH 7,4). Jedan mL tako priređenog PRP-a inkubiran je s tri razrjeđenja flavanona (30, 244 i 488 μM) ili s otapalom (DMSO, 0,8 %) tijekom 15 minuta na 37 °C u suhom termostatu. Alikvot PRP (72 μL) nakon inkubacije PRP-a s flavanonom ili DMSO, pomiješan je s 25 μL 0,1 mM agonista TRAP-6 (konačna koncentracija 21 μM) i prema uputama proizvođača s 20 μL anti-CD61 PE za obilježavanje populacije trombocita ili 20 μL PAC-1 FITC za praćenje aktivnog oblika integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Smjesa je inkubirana u mraku, na sobnoj temperaturi, 30 min. Unutar 15 min nakon završetka inkubacije uzorci su analizirani na protočnom citometru, CXP softverom, na 10.000 događaja pri niskoj brzini protoka. Populacija trombocita je smještana unutar ograde na citogramu veličine FSC (engl. *forward scatter*) i granuliranosti stanica SSC (engl. *side scatter*). Stanice unutar ograde definirane u FSCxSSC citogramu potvrđene su kao trombociti na MFI histogramu srednjeg intenziteta fluorescencije biljega (engl. *mean fluorescence intensity*) kao CD61 PE pozitivni događaji i izražene kao udio (%) (slika 10).



Slika 10. SSC x FSC citogram s ogradom populacije trombocita (A) i histogram CD61-PE pozitivnih stanica u ogradi (B) (rezultati autorice)

Izotipska kontrolna protutijela mišjeg IgM κ FITC i IgG1 PE koristila su se za praćenje razine nespecifičnog pozadinskog signala. Aktivirani trombociti određeni su na histogramu MFI kao udio trombocita s pozitivnim biljegom aktivacije trombocita PAC-1 FITC u ogradi CD61 pozitivnih stanica (slika 11).



Slika 11. Histogram PAC1-FITC pozitivnih trombocita iz ograde na slici 11. A (rezultati autorice)

Mjerenja su se provodila u triplikatu i pratilo se smanjenje udjela PAC-1 FITC pozitivnih stanica, odnosno smanjenje aktivacije. Koncentracija flavanona koja je pokazala statistički značajno smanjenje aktivacije testirala se dodatno na uzorcima pet ispitanika u triplikatu kako bi se potvrdila značajnost antiagregacijskog djelovanja.

3.2.6 Statističke metode

Korelacija vrijednosti hidrofobnog parametra R_M dobivenih eksperimentalno tankoslojnom kromatografijom za 21 flavonoid uspoređene su s teoretski izračunatim vrijednostima log*P* testom linearne regresije programom *Statistica 7.0* na razini značajnosti od 0,05. Linearnom regresijom ispitana je, uz razinu značajnosti od 0,05 i povezanost teoretski izračunatih log*P* vrijednosti (*Chemicalize, ChemSketch, Molinspiration i SwissADME*) s *MINaAC* vrijednostima flavonoida. Studentov *t*-test za uparene uzorke korišten je za potvrdu značajne minimalne antiagregacijske koncentracije flavanona u testu impedancijske agregometrije, uz razinu značajnosti 0,05. Studentov *t*-test za uparene uzorke korišten je i za procjenu značaja utjecaja flavanona na smanjenje aktivacije trombocita praćeno metodom protočne citometrije s fluorescentnim antitijelima, uz razinu značajnosti 0,05. Jednosmjerni ANOVA test uz *post hoc* analizu proveden je korištenjem web aplikacije https://goodcalculators.com/one-way-anova-calculator/, http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/. Njime se ispitala značajnost rezultata zajedničkog djelovanje flavanona i inhibitora PLC, COX-1 i kalcijevih kanala na agregaciju u testovima agregacijske impedancije uz razinu značajnosti 0,05. Istim testom i uz istu razinu značajnosti ispitana je i razlika rezultata antiagregacijskog djelovanja kombinacije flavonoida u odnosu na samostalno djelovanje pojedinačnih flavonoida.

4 REZULTATI

4.1 Parametri lipofilnosti

4.1.1 Kromatografski parametar R_M

Lipofilnost molekule se izražava kao logaritam koeficijenta razdijeljenja *P* za stanje ravnoteže između dva otapala, vode i najčešće *n*-oktanola, koji se ne miješaju.

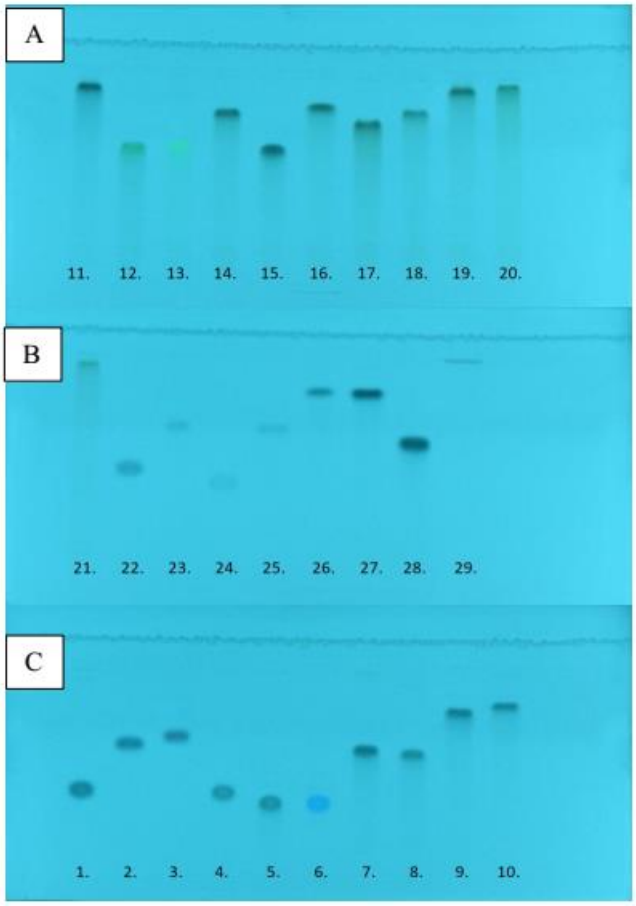
$$\log P = \log (C_{oktanol}/C_{voda}) \quad (1)$$

Ekvivalent log*P* određen metodom TLC-a je R_M.

$$R_F = a/b \quad (2)$$

$$R_M = \log(1/R_F - 1) \quad (3)$$

Ispitivanje je provedeno na 21 flavonoidu. Rezultati su prikazani na kromatogramima (slika 12).



Slika 12. Kromatografska ploče A, B i C s uzorcima flavonoida iz Tablice 4.; detekcija UV-om nakon RP-TLC

Izračunate vrijednosti R_M navedene u tablici 6 zajedno s vrijednostima putovanja ispitivane i mobilne faze, te iz njih proizašlim R_F vrijednostima.

Tablica 6. Rezultati RP-TLC analize flavonoida; određivanje R_M vrijednosti

Redni broj	Pozicija na kromatogramu	Flavonoid	Put ispitivane tvari (a)	Put mobilne faze (b)	R_F	R_M
		flavoni				
1	1	flavon	2,0	6,9	0,29	0,3892
2	2	6-OH-flavon	3,6	6,9	0,52	-0,0378
3	3	7-OH-flavon	3,8	6,9	0,55	-0,0884
4	4	tangeretin	1,9	6,9	0,28	0,4202
5	5	tektokrizin	1,6	6,9	0,23	0,5202
6	6	krizin dimetileter	1,6	6,9	0,23	0,5202
7	7	krizin	3,4	6,9	0,49	0,0126
8	8	akacetin	3,3	6,9	0,48	0,0378
9	9	diosmetin	4,8	6,9	0,70	-0,3590
10	10	apigenin	4,9	6,9	0,71	-0,3892
11	11	luteolin	5,5	6,9	0,80	-0,5942
		flavonoli				
12	12	3,6-diOH-flavon	3,6	6,9	0,52	-0,0378
13	13	3,7-diOH-flavon	3,7	6,9	0,54	-0,0631
14	15	galagin	3,4	6,8	0,50	0,0000
15	17	ramnetin	4,2	6,8	0,62	-0,2083
16	18	izoramnetin	4,6	6,8	0,68	-0,3203
17	19	kvercetin	5,4	6,8	0,79	-0,5863
		flavanoni				
18	22	flavanon	2,9	7,3	0,40	0,3100
19	24	pinocembrin-7-metileter	2,4	7,3	0,33	-0,1076
20	25	pinocembrin	4,1	7,3	0,56	-0,4536
21	26	hesperetin	5,4	7,3	0,74	0,1811

Kromatografski parametri R_M, eksperimentalno određeni, bili su u rasponu od -0,5942 do 0,5202. Najveće vrijednosti R_M zabilježene su za tektokrizin i krizin-dimetileter kao najlipofilnije, a najniže za luteolin kao najhidrofilniji spoj.

4.1.2 Računalne vrijednosti log*P*

U tablici 7 navedene su vrijednosti log*P* dobivene putem programskih paketa *Chemicalize*, *ChemSketch*, *Molinspiration* i *SwissADME*. Vrijednosti log*P* su se kretale od 2,18 za tangeretin do 3,28 za pinocembrin-7-metileter prema aplikaciji *Chemicalize.* I prema *ChemSketch* aplikaciji pinocembrin-7-metileter je najlipofilniji s log*P* 4,11 dok je najmanje lipofilan izoramnetin, 1,76. *Molinspiration* i *SwissADME* su izračunale najmanje vrijednosti logP za kvercetin (1,68 i 1,23) dok je prema *Molinspiration* najlipofilniji flavonoid u grupi tangeretin (log*P* 3,78) a za *SwissADME* flavon (log*P* 3,18*).*

Tablica 7. Računalni parametar flavonoidne lipofilnosti, log*P*

Flavonoid	logP_ ChemAxon	logP_ ChemSketch	logP_ Molinspiration	Swiss_ ilogP	Swiss_ xlogP3	Swiss_ wlogP	Swiss_ mlogP	Swiss_ silicos-it	Swiss_ consensuslogP
Flavoni									
Flavon	2,97	3,56	3,74	2,55	3,56	3,46	2,27	4,04	3,18
6-hidroksiflavon	2,66	3,72	3,23	2,28	3,62	3,17	1,66	3,52	2,85
7-hidroksiflavon	2,66	3,32	3,23	2,22	3,62	3,17	1,66	3,52	2,84
Tangeretin	2,18	2,66	3,78	3,71	3,04	3,5	0,63	4,21	3,02
Tektokrizin	3,16	3,13	3,48	2,88	3,85	3,17	1,33	3,52	2,95
Krizin dimetileter	3,01	3,27	3,75	2,95	3,62	3,48	1,57	4,04	3,13
Krizin	3,01	2,88	2,94	2,27	3,52	2,87	1,08	3,02	2,55
Akaketin	2,85	3,15	3,00	2,56	3,35	2,88	0,77	3,03	2,52
Diosmetin	2,55	3,10	2,28	2,47	3,10	2,59	0,22	2,55	2,19
Apigenin	2,71	2,10	2,46	1,89	3,02	2,58	0,52	2,52	2,11
Luteolin	2,4	2,40	1,97	1,86	2,53	2,28	-0,03	2,03	1,73
Flavonoli									
3,6-dihidroksiflavon	2,42	3,64	2,94	1,97	3,05	2,87	1,08	3,02	2,4
3,7-dihidroksiflavon	2,42	3,27	2,94	2,01	3,05	2,87	1,08	3,02	2,4
Galangin	2,76	2,83	2,65	2,08	2,25	2,58	0,52	2,52	1,99
Ramnetin	2,3	2,58	2,22	2,23	1,87	2,29	-0,31	2,06	1,63
Izoramnetin	2,3	1,76	1,99	2,35	1,87	2,29	-0,31	2,06	1,65
Kvercetin	2,77	2,07	1,68	1,63	1,54	1,99	-0,56	1,54	1,23
Flavononi									
Pinocembrin-7-metileter	3,28	4,11	3,13	2,75	3,2	2,78	1,52	3,06	2,66
Pinocembrin	3,14	3,93	2,60	2,11	2,88	2,48	1,27	2,55	2,26
Hesperetin	2,68	2,90	1,94	2,24	2,6	2,19	0,41	2,08	1,91
Flavanon	3,1	3,62	3,18	2,41	3,14	3,07	2,47	3,57	2,93

4.1.3 Povezanost eksperimentalnih i računalnih vrijednosti parametara lipofilnosti

Rezultati linearne regresije za višestruke log*P* (tablica 7) i R_M pokazali su snažnu pozitivnu korelaciju među vrijednostima ova dva parametra lipofilnosti kada su za izračun log*P* korištene programske aplikacije *Molinspiration* (r=0,93 p<0,001) i konsenzus vrijednost aplikacije *SwissADME* (r=0,86 p<0,001), vrijednosti koeficijenta razdijeljenja dobivene putem *ChemSketch* aplikacije i *Chemicalize* pokazale su umjerenu pozitivnu korelaciju (r=0,55, p=0,009 i r=0,44 p=0,04) s vrijednostima hidrofobnog parametra R_M (tablica 6).

Tablica 8. Rezultati regresijske analize za R_M i log*P* za flavonoide iz Tablice 1.

Aplikacija	Prilagođen r^2	Višestruki r	p vrijednost
logP_ChemAxon	0,16	0,44	0,0434
logP_ChemSketch	0,26	0,55	0,009
logP_Molinspiration	0,85	0,93	<0,001
Swiss_ilogP	0,56	0,77	<0,001
Swiss_xlogP3	0,40	0,66	0,0012
Swiss_wlogP	0,73	0,86	<0,001
Swiss_mlogP	0,47	0,70	<0,001
Swiss_silicos-it	0,75	0,87	<0,001
Swiss_consensuslogP	0,73	0,86	<0,001

4.1.4 Povezanost računalnih vrijednosti parametara lipofilnosti i antiagregacijskog učinka

Regresijskom analizom *MINaAC* uz agonist ADP, preuzetih iz rada Bojić i sur. (2011), za sve flavonoide osim za flavanon, čiji je *MINaAC* određen u ovom istraživanju, kada je promatrana cijela grupa (21 flavonoid) nije utvrđena korelacija s log*P* niti za jedan programski paket. Kada su testirane pojedine skupine flavonoida ili njihove kombinacije utvrđena je statistički značajna snažna negativna korelacija *MINaAC* grupe flavona (r = -0,76, p = 0,0033)

i umjerena negativna korelacija (r= -0,59 p = 0,0201) za skupinu flavona i flavanona (Tablica 9) s log*P* vrijednostima dobivenim putem programa *Chemicalize*.

Tablica 9. Rezultati regresijske analiza za log*P* i *MINaAC* uz agonist ADP za flavone, flavanole i flavanone

	Flavoni	***Flavonoli***	***Flavanoni***	***Flavoni* + *Flavonoli***	***Flavoni* + *Flavanoni***	***Flavonoli* + *Flavanoni***
				Koeficijent korelacije, r		
logP_ChemAxon	-0,76*	0,67	0,16	-0,01	-0,59*	0,07
logP_ChemSketch	-0,27	0,01	0,30	-0,12	-0,21	-0,15
logP_Molinspiration	0,19	0,13	-0,22	-0,06	0,15	-0,004
Swiss_ilogP	0,54	0,01	-0,67	-0,03	0,41	-0,19
Swiss_xlogP3	-0,36	-0,10	-0,27	-0,30	-0,23	-0,24
Swiss_wlogP	0,24	0,04	-0,36	-0,11	0,18	-0,05
Swiss_mlogP	-0,25	0,10	-0,22	-0,14	-0,27	-0,13
Swiss_silicos-it	0,28	0,03	-0,37	-0,11	0,20	-0,11
Swiss_consensuslogP	0,12	0,02	-0,36	-0,16	0,05	-0,16

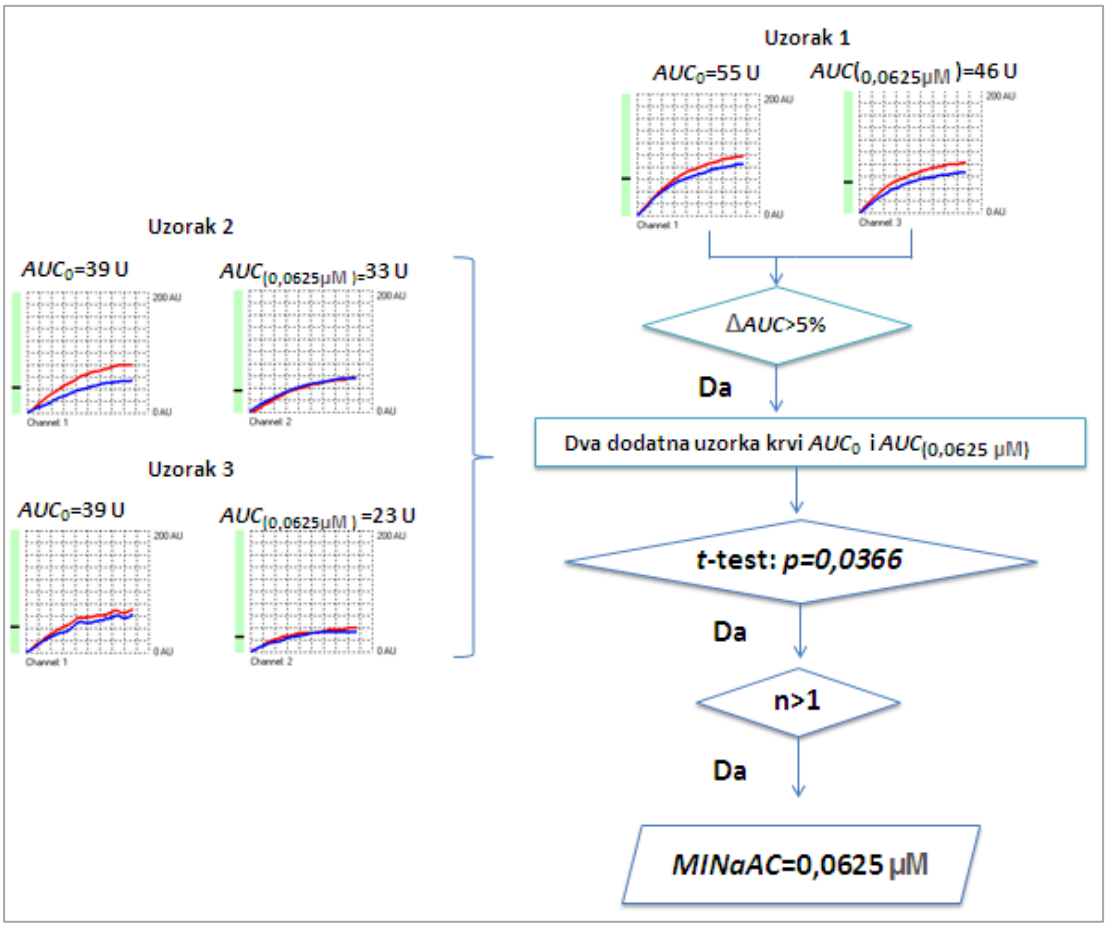
*p<0,01

4.2 Antiagregacijski učinak flavonoida

Kako bi se odredila sveobuhvatnost mehanizma djelovanja flavonoida na aktivaciju trombocita ispitano je uz različite agoniste agregacije djelovanje kombinacija flavonoida i inhibitora određenih signalnih točaka: PLC, COX-1 i inhibitora kalcijevih kanala. Određivanjem antiagregacijskog učinka kombinacija različitih i istih grupa flavonoida uz različite agoniste agregacije ispitane su njihove moguće interakcije nakon unosa flavonoida hranom.

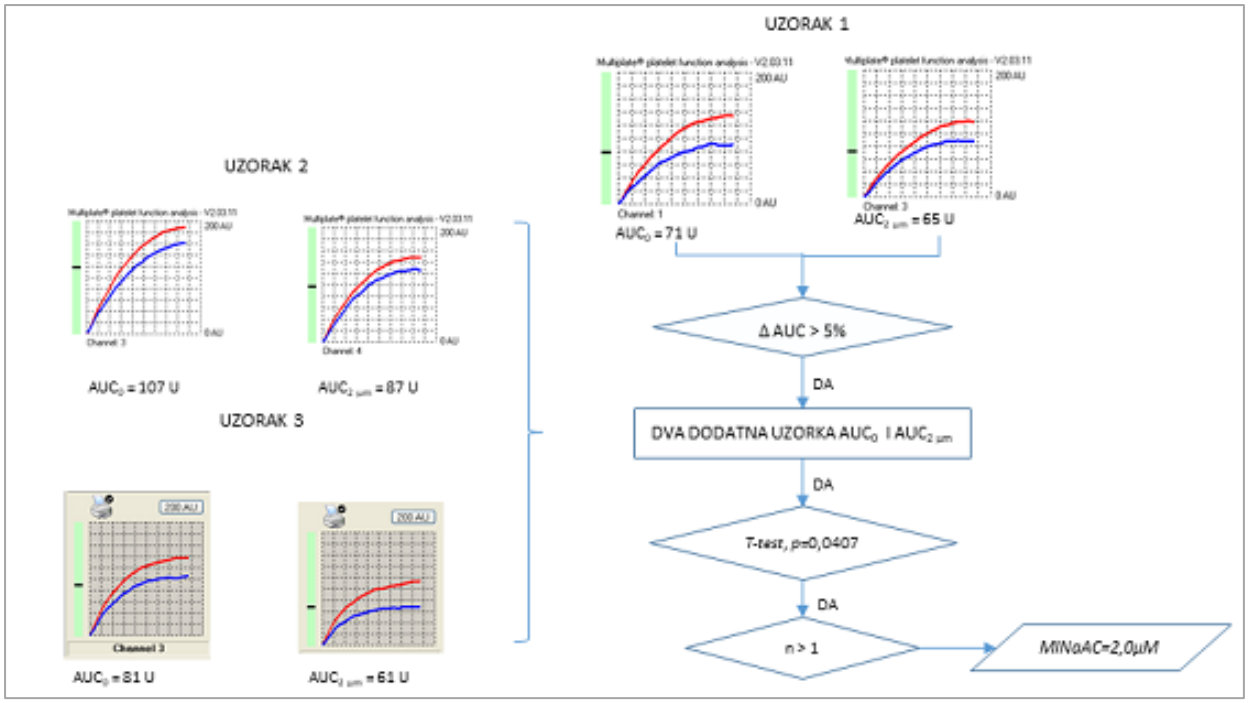
4.2.1 Određivanje *MINaAC* flavanona

MINaAC flavanona pokazuje najniže vrijednosti od samo 0,063 µM kada je agregacija trombocita potaknuta ADP-om kao slabim agonistom.



Slika 13. Postupak i rezultati određivanja *MINaAC* flavanona uz agonist ADP (6,3 µM) na tri nezavisna uzorka primjenom jednosmjernog T-testa za uparene uzorke uz razinu značajnosti 0,05.

Pri djelovanju TRAP-6, kao jakog agonista, flavanon postiže prvu značajnu razinu utjecaja pri koncentraciji 2 µM. Na slici 15 prikazan je postupak određivanja *MINaAC* za flavanon uz TRAP-6 kao agonist.



Slika 14. Postupak određivanja *MINaAC* flavanona uz agonist TRAP-6 (31 µM) na tri nezavisna uzorka primjenom jednosmjernog T-testa za uparene uzorke uz razinu značajnosti 0,05.

Istim postupkom utvrđene su *MINaAC* flavanona za ostale agoniste agregacije koji su prikazani u tablici 10.

Tablica 10. Učinci flavanona na agregaciju trombocita ovisno o korištenom agonistu, izraženi kao *MINaAC* u µM, sa statističkom značajnošću p (jednosmjerni t-test za uparene uzorke)

	Agonist	***MINaAC* (µM)**	**p***
Flavanon	ADP	0,063	0,0366
	TRAP-6	2,000	0,0310
	Kolagen	0,500	0,0175
	Ristocetin	0,500	0,0270
	AA	0,500	0,0037

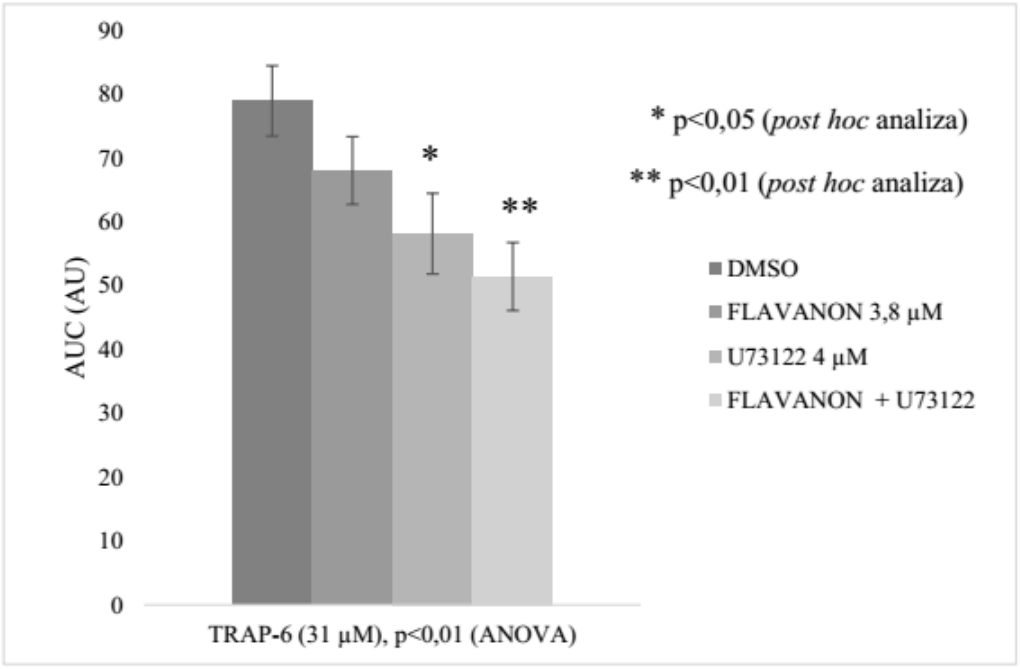
*usporedba rezultata za uzorke s i bez dodatka flavanona uz konačne koncentracije agonista: 6,3 µM ADP, 3,1 µg/mL kolagena, 31 µM TRAP-6, 0,48 µM AA, 0,3 mg/mL ristocetina

4.2.2 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora PLC (U-73122), COX-1 (indometacin) i kalcijevih kanala (verapamila) na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona

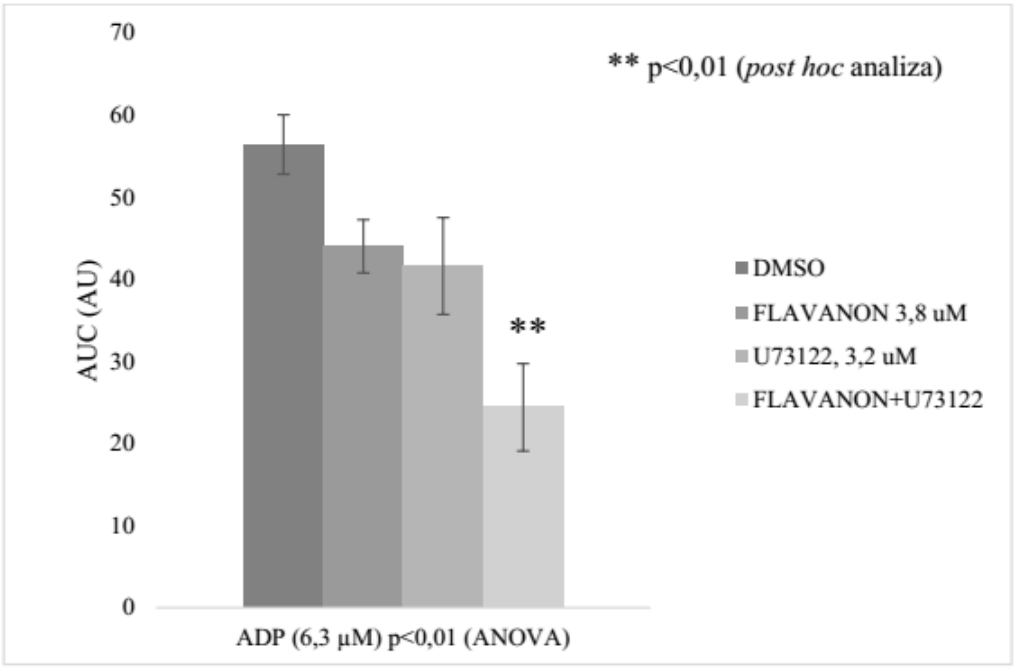
Rezultati eksperimenata koji su ispitivali zajednički inhibicijski učinak na agregaciju provedeni su na Multiplate® analizatoru. Rezultati su testirani na statističku značajnost za svaku skupinu, ovisno o korištenom inhibitoru i agonistu jednosmjernim ANOVA testom s *post-hoc* analizom rezultata. Rezultati su prikazani u obliku grafikona vrijednosti agregacije u ovisnosti o kombinaciji flavonoida, inhibitora i agonista.

4.2.2.1 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora PLC (U-73122) na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona

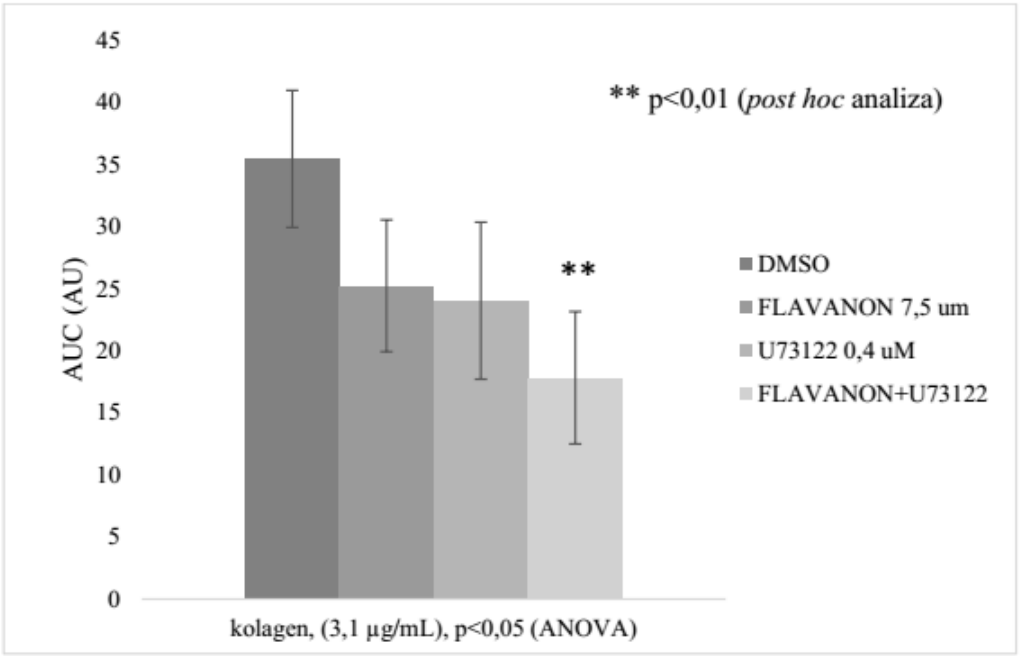
Flavanon djeluje na PLC značajno smanjujući njenu aktivnost u kombinaciji s U-73122 u odnosu na samostalno inhibitorno djelovanje U-73122. Značajan utjecaj flavanona na PLC prisutan je uz agoniste TRAP-6, ADP i kolagen (slike 15-17).



Slika 15. Učinak zajedničkog antiagregacijskog djelovanja flavanona i U73122, inhibitora PLC-a, uz agonist TRAP-6, p vrijednosti ANOVA testa i *post hoc* analize



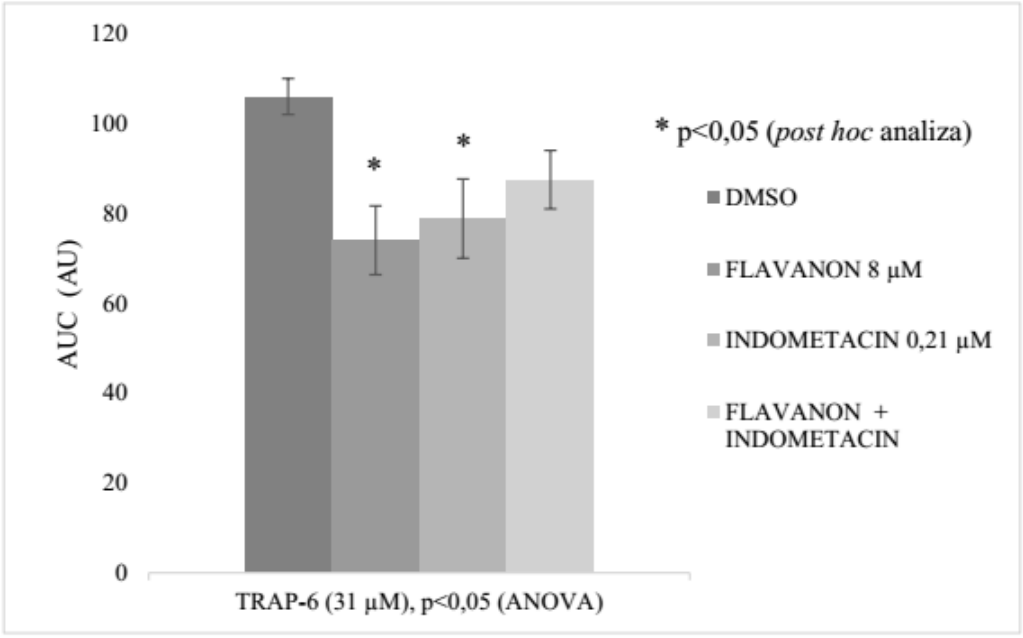
Slika 16. Učinak zajedničkog antiagregacijskog djelovanja flavanona i U73122, inhibitora PLC-a, uz agonist ADP, p vrijednosti ANOVA testa i *post hoc* analize



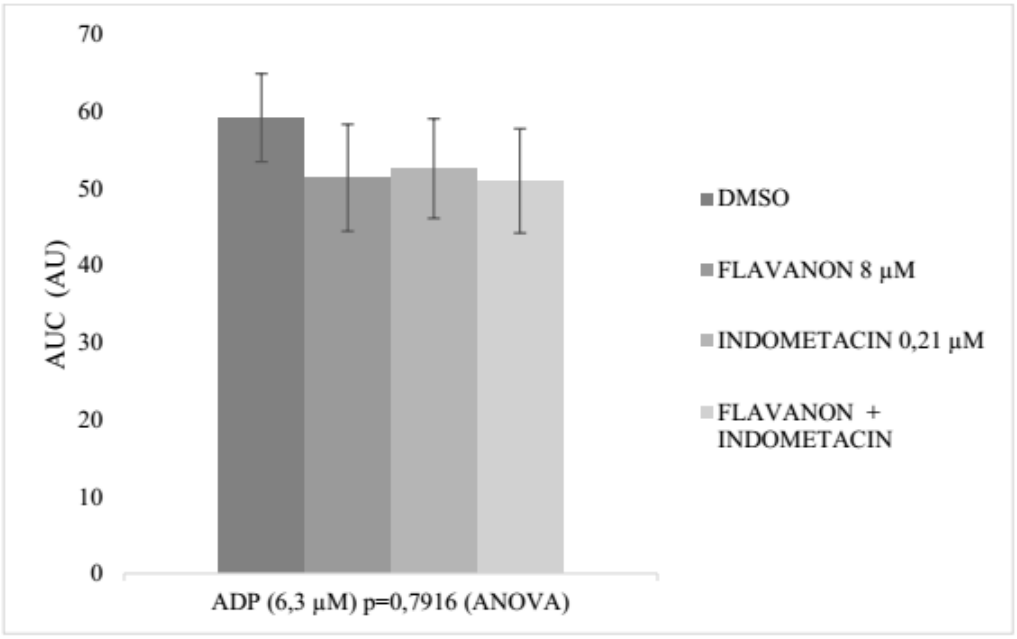
Slika 17. Učinak zajedničkog antiagregacijskog djelovanja flavanona i U73122, inhibitora PLC, uz agonist kolagen, p vrijednosti ANOVA testa i *post hoc* analize

4.2.2.2 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora COX-1 (indometacina) na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona

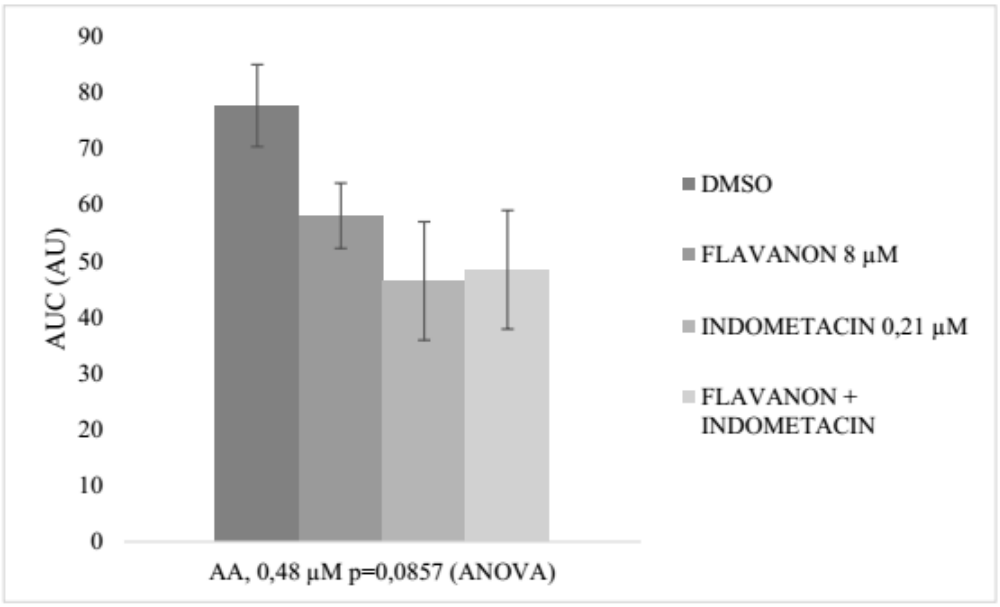
U ispitivanjima utjecaja flavanona na put aktivacije posredovan enzimom COX-1, neovisno o korištenim agonistima (TRAP-6, ADP, AA) flavanon nije pojačao inhibicijsko djelovanje indometacina te stoga ne pokazuje utjecaj na aktivnost enzima COX-1 (slike 18-20). Naime, iako rezultati ANOVA testa ukazuju na statistički značajnu razliku u učincima u odnosu na rezultate za kontrolu (DMSO), rezultati *post hoc* analize pokazuju statistički značajan antiagregacijski utjecaj u prisustvu TRAP-6 kao agonista za samostalno djelovanje flavanona i indometacina.



Slika 18. Učinak zajedničkog antiagregacijskog djelovanja flavanona i indometacina, inhibitora COX-1, uz agonist TRAP-6, p vrijednosti ANOVA testa i *post hoc* analize



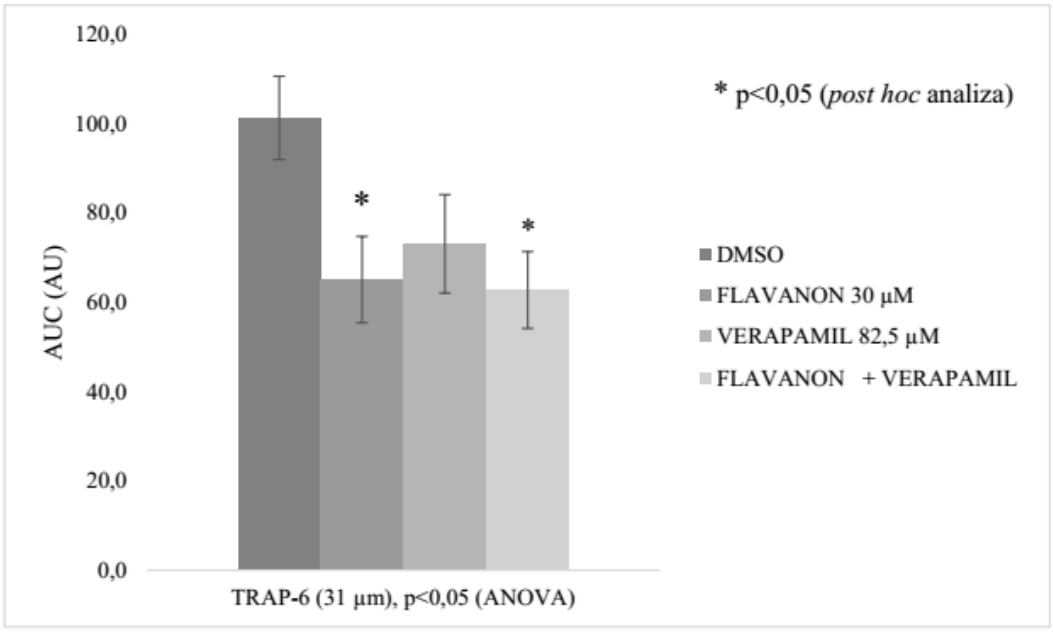
Slika 19. Učinak zajedničkog antiagregacijskog djelovanja flavanona i indometacina, inhibitora COX-1, uz agonist ADP uz iskazane p vrijednosti ANOVA testa



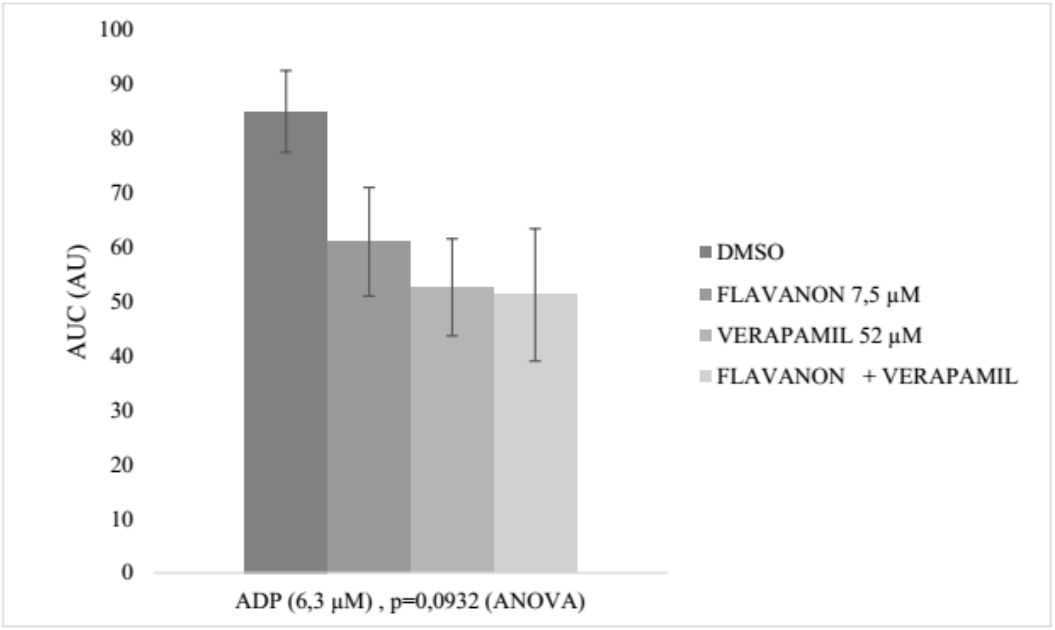
Slika 20. Učinak zajedničkog antiagregacijskog djelovanja flavanona i indometacina, inhibitora COX-1, uz agonist AA, p vrijednosti ANOVA testa

4.2.2.3 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora kalcijevih kanala (verapamila) na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona

Inhibicijsko djelovanje flavanona na kalcijeve kanale uz verapamil opaženo je samo uz jak agonist TRAP-6, iako je uz taj agonist prisutno i statistički značajno samostalno antiagregacijsko djelovanje flavanona (slika 21), dok uz slab agonist ADP nije prisutna statistički značajna razlika u antiagregacijskom djelovanju, kako u samostalnom tako i u kombinaciji flavanona i inhibitora verapamila (slika 22).



Slika 21. Učinak zajedničkog antiagregacijskog djelovanja flavanona i verapamila, inhibitora kalcijevih kanala, uz agonist TRAP-6 uz iskazane p vrijednosti ANOVA testa i *post hoc* analize



Slika 22. Učinak zajedničkog antiagregacijskog djelovanja flavanona i verapamila, inhibitora kalcijevih kanala, uz agonist ADP, rezultati obrađeni ANOVA testom uz razinu značajnosti 0,05

4.2.3 Povećanje inhibitornog djelovanja 6-hidroksiflavona i pinocembrin-7-metiletera na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona

Rezultati ispitivanja zajedničkog utjecaja kombinacije flavonoida primijenjenih u svojim *MINaAC* koncentracijama u prisustvu agonista agregacije: ADP, TRAP-6, kolagen i AA testirani su ANOVA jednosmjernih testom, uz razinu statističke značajnosti 0,05 s *post-hoc* analizom (tablica 11). Statistički značajna razlika između rezultata za negativnu kontrolu (DMSO) i rezultata samostalnog djelovanja svakog od flavonoida (flavanona, 6-hidroksiflavona, pinocembrin-7-metiletera), u odnosu na kombinacije flavonoida, uočena je uz agoniste TRAP-6, ADP i AA za kombinaciju flavanona i 6-hidroksiflavona, flavanona i pinocembrin-7-metiletera te 6-hidroksiflavona i pinocembrin-7-metiletera. Uz agonist kolagen niti jedna kombinacija nije ostvarila statistički značajan pojačan antiagregacijski učinak. Kombinacija flavanona i 6-hidroksiflavona ostvarila je povećanje inhibicije agregacije u zajedničkom djelovanju uz agoniste TRAP-6, ADP i AA. Kombinacija flavanona i pinocembrin-7-metiletera uz ADP pokazuje statistički značajan učinak koji izostaje uz TRAP-6 kao induktor agregacije. Pinocembrin-7-metileter ostvaruje statistički značajnu antiagregacijsku aktivnost uz 6-hidroksiflavon i AA kao induktor.

Tablica 11. Zajednički inhibitorni učinak flavanona, 6-OH-flavona i pinocembrin-7-metiletera uz različite agoniste agregacije (TRAP-6, ADP, kolagen, AA), testiran jednosmjernim ANOVA i *post-hoc* testom *Bonferroni i Holm T*-statistika na razini značajnosti 0,05

Flavonoidi#	One-way ANOVA		Post-hoc versus DMSO	One-way ANOVA		Post-hoc versus DMSO	One-way ANOVA		Post-hoc versus DMSO	Flavonoidi	One-way ANOVA		Post-hoc versus DMSO
	TRAP-6 (31 μM)			ADP (6,3 μM)			Kolagen (3,1 μg/mL)				AA (0,48 μM)		
	p	F-stat	P	p	F-stat	p	p	F-stat	p		p	F-stat	p
DMSO			-			-				DMSO			-
flavanon			1,07			0,35				6-OH-flavon			0,15
6-hidroksiflavon	0,01*	5,38	0,58	0,002**	8,74	0,05	0,20	1,81	NA	pinocembrin-7-metileter	0,02*	4,8613	0,09
flavanon + 6-hidroksiflavon			0,03*			0,001**				6-OH-flavon+ pinocembrin-7-metileter			0,008**
DMSO			-			-				DMSO			-
flavanon			1,12			0,46				6-OH-flavon			0,46
pinocembrin-7-metileter	0,32	1,29	0,85	0,03*	4,34	0,19	0,78	0,36	NA	flavanon	0,01*	5,4055	0,37
flavanon+ pinocembrin-7-metileter			0,63			0,02*				6-OH-flavon+ flavanon			0,007**

Flavonoidi priređeni u *MINaAC* prema radu
*p<0,05
**p<0,01

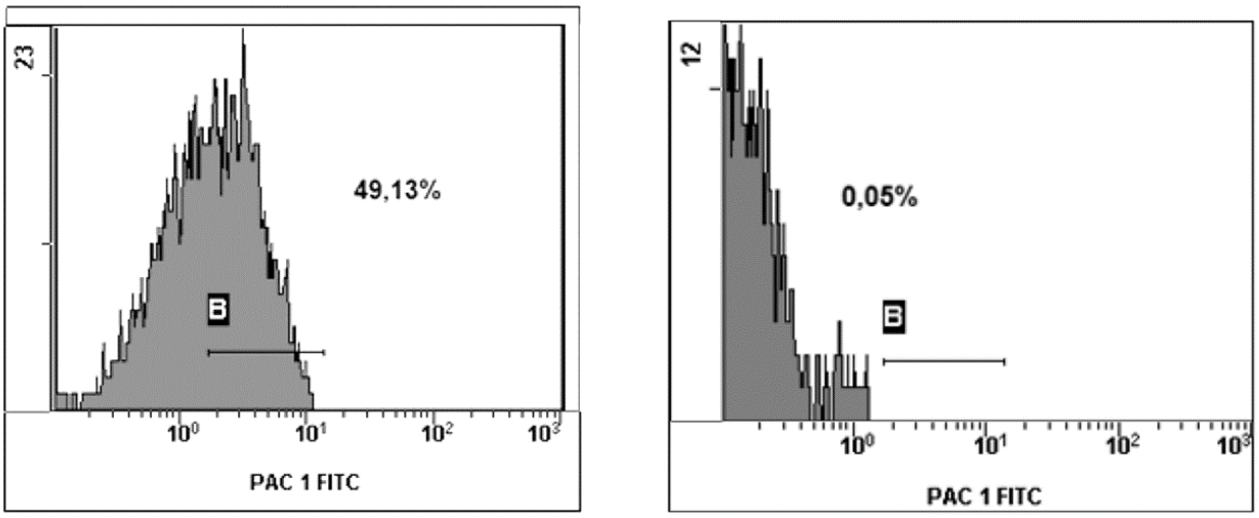
4.3 Utjecaj flavonoida na aktivaciju trombocita (površinsku ekspresiju receptora)

Populacija trombocita izdvojena je u citogramu veličine i zrnatosti stanica SSCxFSC, te definirana antitijelom specifičnim za populaciju trombocita CD61-PE. Tako postavljena ograda koristila se u nastavku eksperimenata za procjenu udjela aktiviranih trombocita.

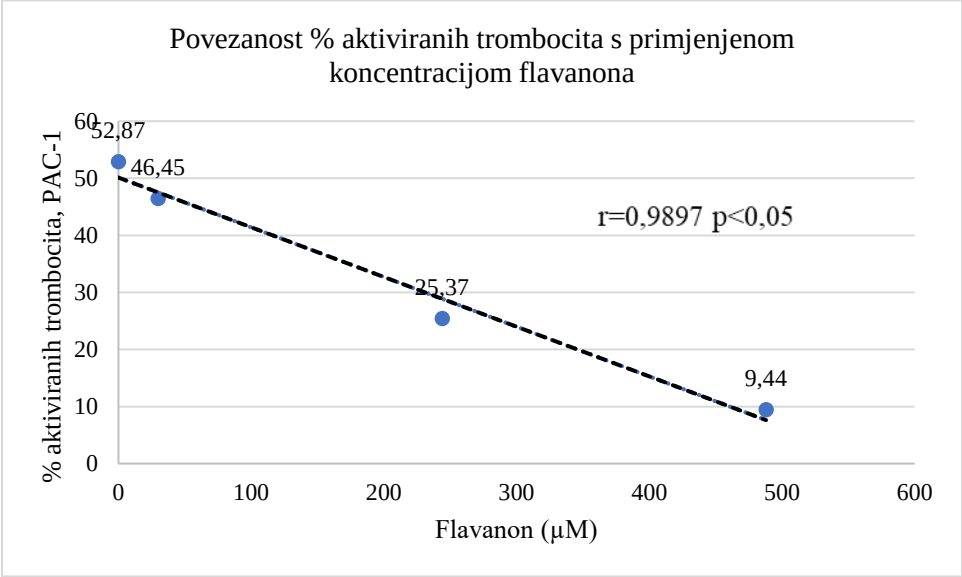
Aktivacija trombocita putem *inside-out* signalizacije praćena je pojavom konformacije aktivnog oblika integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Metoda protočne citometrije vrijednošću srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) pokazala je udio aktiviranih trombocita koji su PAC-1 pozitivni u uzorcima nakon inkubacije s različitim koncentracijama flavanona u odnosu na uzorke koji su se inkubirali samo s otapalom DMSO. Na histogramu MFI za PAC-1 može se pratiti pomak histograma ulijevo u uzorcima nakon inkubacije s flavanonom što predstavlja smanjenje broja aktiviranih trombocita (slika 23).

U ispitivanju različitih koncentracijskih razina flavanona i njihovog inhibicijskog učinka na aktivaciju trombocita opaženo je da razina učinka ovisi o primijenjenoj koncentraciji, uz statistički značajnu negativnu korelaciju (slika 24), ali postiže statistički značajan učinak inhibicije aktivacije trombocita samo pri koncentraciji od 488 μM u usporedbi s negativnom kontrolom. Inhibicijski utjecaj 488 μM flavanona na smanjenje aktivacije trombocita praćenjem biljega aktivacije PAC-1 potvrđen je analizom na pet neovisnih uzoraka krvi, $p=0,0018$, uz razinu značajnosti 0,05 (Studentov t-test za uparene uzorke) (slika 25).

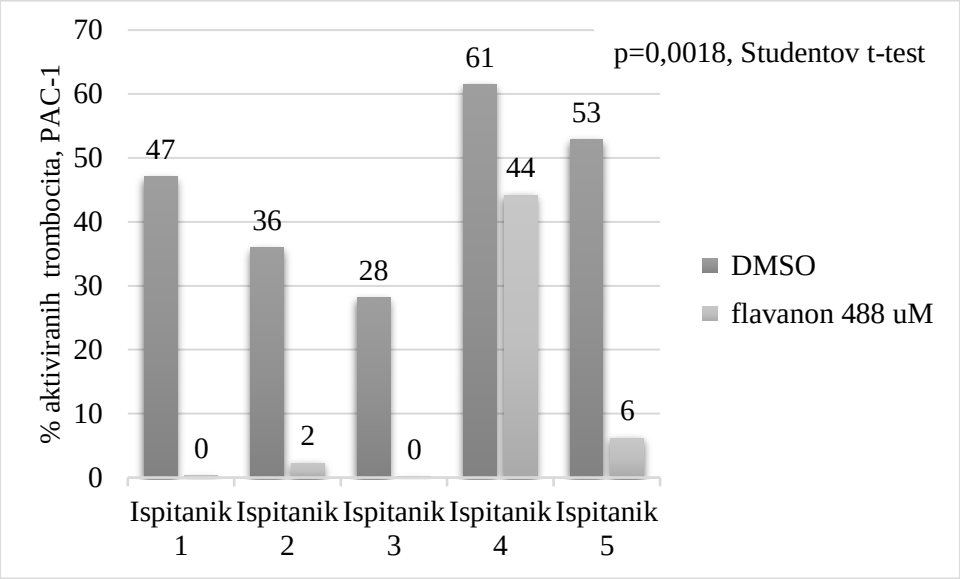
A **B**



Slika 23. Pomak histograma srednjeg intenziteta fluorescencije (MFI) u uzorku s DMSO (A) i s flavanonom, 488 uM (B) uz agonist aktivacije TRAP-6 (21 µM)



Slika 24. Grafički prikaz ovisnost smanjenja aktivacije trombocita o koncentraciji flavanona-praćenjem udjela PAC-1 pozitivnih trombocita nakon inkubacije s flavanonom, uz agonist TRAP-6 (21 µM), metodom protočne citometrije, uz iskazivanje koeficijenta korelacije (r)



Slika 25. Grafički prikaz aktivacije trombocita u uzorcima 5 ispitanika nakon 15 min inkubacije trombocita s otopinom flavanona (488) μM u odnosu na uzorke tretirane samo otapalom (DMSO), uz agonist TRAP-6 (21 μM). Aktivacija trombocita bilježena je kao postotak PAC-1 pozitivnih stanica u MFI histogramu.

5 RASPRAVA

5.1 Lipofilnost flavonoida

Spojevi iz prirode s antiagregacijskim svojstvima nalaze svoje prednosti u pleiotropnosti učinka, mogućem sinergističkom djelovanju, kao i u smanjenju nuspojava povezanih s trenutnim terapijskim modelima (Rasines-Perea and Teissedre, 2017) (Bijak *et al.*, 2019).

Antiagregacijsko djelovanje flavonoida istraživanih u ovom radu predstavlja još jedan dokaz potencijalne farmakološke primjene spojeva iz svakodnevne prehrane, kao dodatne terapije uz standardnu antiagregacijsku terapiju, a posebice kod bolesnika kod kojih ta terapija nije učinkovita. Flavonoidi imaju izvrstan sigurnosni profil (nema toksičnosti do 140 g/dan) i nemaju poznatih značajnih nuspojava (Hertog i sur., 1993). Upravo je višestruko djelovanje osnova novijih preporuka u terapiji određenih kliničkih oblika KVB-a. Tako Montalescot i Sabatine, (2016) u svom preglednom radu zaključuju da dualna antiagregacijska terapija popravlja izglede nakon akutnog srčanog zatajenja i/ili perkutane koronarne intervencije. Prema radu Zhu i sur., (2015) kreiran je prolijek aspirina s reservatrolom koji bi trebao ublažiti nuspojave odnosno krvarenja gastrointestinalnog trakta uzrokovanog dugotrajnom terapijom aspirinom. Navarro-Núñez i sur., (2008) su dokazali na *ex vivo* eksperimentima statistički značajno pojačano antiagregacijsko djelovanje aspirina u prisutnosti apigenina. U jednostavnom eksperimentu Zubair i sur., (2011) pokazali su da je uzimanje čokolade uz aspirin značajno produžilo vrijeme krvarenja u grupi zdravih ispitanika. Procjenjujući farmakološke potencijale flavonoida važno je ispitati stupanj bioaktivnog djelovanja temeljem njihovih fizikalno-kemijskih svojstva. Među njima, lipofilnost je svojstvo koje bi omogućilo bolju aktivnost flavonoida u biosustavima.

5.1.1 Povezanost kromatografskih i računalnih parametara lipofilnosti

Mukotrpne i dugotrajne eksperimente izmućkavanja pomoću sustava *n*-oktanol:voda još uvijek predstavljaju zlatni standard određivanja lipofilnosti molekula. Njih u svakodnevnom radu sve više zamjenjuju metode RP-TLC i RP-HPLC zbog svojih brojnih prednosti (brzina, jednostavnost, mogućnost nanošenja većeg broja spojeva, smanjeni zahtjevi čistoće spojeva itd.). Rezultati RP-TLC analize na skupini od 21 flavonoida (slika 11 i tablica 6) izdvojili su kao najlipofilnije tektokrizin i krizin dimetileter, a kao najhidrofilniji spoj luteolin. Tektokrizin i krizin dimetileter nemaju supstituirani B prsten, a dvije hidroksilne skupine na A prstenu su djelomično odnosno potpuno metilirane. Određivanje lipofilnosti molekula od izuzetne je važnosti u QSAR

modeliranju koje je nezaobilazno u ispitivanju potencijalnih, novih terapijski aktivnih spojeva. Ne umanjujući vrijednost eksperimentalno određenih vrijednosti, računski pristupi imaju mnoge prednosti jer ne zahtijevaju skupe instrumente, reagense i naporan eksperimentalni rad (Stoica i sur., 2018). Korištenje dostupnih programskih aplikacija za predviđanje svojstava kemijskih spojeva danas je standard rada znanstvene i stručne zajednice temeljem svoje praktičnosti. Važno područje farmakoloških ispitivanja je proučavanje bioaktivnosti spojeva koji predstavljaju potencijalne nove lijekove. Lipofilnost je nedvojbeno iznimno važna za bioaktivnost tvari, a samim time i parametri koji ju opisuju. Programske aplikacije nude početan, jednostavan, brz način za izračun log*P* parametra koji predstavlja mjeru lipofilnosti molekule, a samim time i propusnosti kroz stanične membrane (Bennion i sur., 2017). Modeli za izračun log*P* različitih programskih aplikacija zbrajaju vrijednosti parametara sadržanih u njihovim bazama. Ti se parametri odnose ili na razinu atoma ili na razinu fragmenata molekule. Upravo po tome se razlikuju dva osnovna načela rada ovih aplikacija. Metoda koja koristi velike baze podataka mjerenja na razini atoma je prihvatljivija za jednostavnije molekule dok je za veće, kompleksnije molekule, prihvatljivija fragmentarna metoda. U načelu, modeli koji se baziraju na fragmentarnom pristupu su točniji. Model fragmentarnog pristupa omogućuje izračun deskriptora lipofilnosti kao zbroja vrijednosti fragmenta uzimajući ih uz određene faktore korekcije (npr. tautomerizacijske, ionizacijske, intramolekularne interakcije) (Kłosińska-Szmurło i sur., 2014).

U ovom istraživanju korištenim aplikacijama *Molinspiration, Chemicalize, ChemSketch* i *SwissADME* određeni su log*P* vrijednosti temeljem podataka u odgovarajućim bazama za promatranu skupinu flavonoida. Svih 21 promatranih flavonoida zadovoljavaju pravilo Lipinski i sur. (2001) vezano uz zahtjev za dobru bioraspoloživost spoja nakon oralne primjene ukoliko je njegov log*P*<5. Usporedbom eksperimentalno određenog R_M parametra i teoretskog log*P* (tablica 7 i 8) izračunatog putem programskih aplikacija *Molinspiration* i *Swiss ADME* nađena je snažna pozitivna korelacija lipofilnosti (r=0,8631 i 0,9283 p<0,001) te umjereno pozitivna korelacije s log*P* *ChemSketch*-a i *Chemicalize*-a (r=0,5454, p=0,009 i r=0,4448, p=0,0434). Rothwell i sur. (2005) u svom su istraživanju precizno odredili eksperimentalni log*P* za grupu flavonoida i usporedili ih sa saznanjima o njihovom metabolizmu. U njihovom je istraživanju luteolin, s log*P* 3,22 bio najlipofilniji dok je kvercetin-3-sulfat bio najhidrofilniji, log*P* -1,11. Kvercetin je bio najhidrofilniji od svih aglikona, log*P* 1,82, a konjugati promatranih flavonoida općenito su imali značajno niže vrijednosti log*P*. Stoica i sur., (2018) istraživali su derivate tiazolil-1,3,4-

oksadiazole koji pokazuju antitumorsku, antibakterijsku, antifungalnu, anti-tuberkuloznu i protuupalnu aktivnost. Eksperimentalne podatke o retenciji, R_M su usporedili s izračunatim log*P* putem XLOGP, FILTER-IT, ALOGPS programskih paketa i dobili koeficijente korelacije koji su se kretali od 0,64-0,82. Kasperkiewicz i sur., (2018) istraživali su lipofilnost devet derivata kumarina kao potencijalnih antiagregacijskih spojeva i uspoređujući njihove eksperimentalne R_M vrijednosti s log*P* vrijednostima *Molinspiration* aplikacije dobili koeficijent korelacije r=0,99. Mogućnosti primjene kromatografskih parametara pokazalo je istraživanje grupe Bober i sur. (2019) na novosintetiziranim derivata botulina. Njihovi su rezultati ukazali na visoku korelaciju eksperimentalno dobivenog log*P* (ALOGPS, AClogP, miLogP, ALOGP, MLOGP, XLOGP2, XLOGP3) s R_M vrijednosti. Koeficijent korelacije kretao se, ovisno o mobilnoj fazi od 0,87-0,99. Na znatno većoj grupi, od 190 molekula lijekova, Pyka i sur. (2006) su dobili vrlo visok koeficijent korelacije (0,93-0,95) prema podacima prikupljenim iz literature o eksperimentalno određenim log*P* u bifaznom sustavu *n*-oktanol:voda temeljem s teoretski dobivenim rezultatima putem aplikacijama Alog*P*s, IAlog*P*, Clog*P*, miLog*P*, logP_{Kowwin}, xlog*P*.

5.1.2 Povezanost računalnih parametara lipofilnosti i aktivnosti flavonoida

Istraživanja u kojima se lipofilnost flavonoida povezivala s njihovom aktivnošću su brojna. Kada se promatrao inhibicijski utjecaj flavonoida na aktivnost Syk kinaze na kulturama humanih mastocita, uočena je značajna korelacija tek kad je bila uračunata vrijednost Clog*P (*Shichijo i sur., 2003). Vrijednost log*P* kao molekulskog deskriptora flavonoida očituje se i njegovim prisustvom u globalnim modelima za procjenu toksičnosti flavonoida u metabolizma sisavaca *(*Oliveira Filho i sur., 2015). Log*P* kao mjera lipofilnosti nudi istraživačima vrlo prikladan način predviđanja mogućeg stupnja djelovanja flavonoida *in vivo* predviđajući njihove interakcije s biomembranama. Prema Programskom paketu *Chemicalize* utvrđeni log*P* pokazuje umjerenu pozitivnu korelaciju s RP-TLC R_M vrijednostima (tablica 8), kada se ispitivala povezanost minimalne antiagregacijske koncentracije dobivena je snažna negativna korelacija za skupinu flavona $r=0,76$ $p < 0,01$ te umjerena negativna kada se zajedno promatrala grupa flavona i flavanona $r=-0,59$ $p < 0,05$ (tablica 9). To je u skladu s očekivanjima da veća vrijednost log*P*, tj. veća lipofilnost, pretpostavlja i veću biološku aktivnost odabrane skupine flavonoida i stoga manju koncentraciju potrebnu za opažanje njihovog inhibicijskog učinka. Pravila 5 (Lipinski i sur., 2001) među ostalim, pretpostavljaju

terapijsku neučinkovitost spjeva s log*P* većim od 5, zbog visoke lipofilnosti uslijed koje bi spojevi ostali zadržani u membrani stanice. U kontekstu trombocita, zadržavanje u membrani moglo bi dati na značaju flavonoidima s najvećim vrijednostima log*P*.

Utjecaj flavonoida na membranu trombocita u velikoj bi mjeri mogao modulirati njihovu agregacijsku sposobnost. Kitagawa i sur., (1993) su u svom istraživanju koristeći model trombocita goveda i metodu fluorescentne anizotropije difenilheksatriena (DPH) opazili smanjenje anizotropije, odnosno povećanje fluidnosti hidrofobne jezgre lipidnog dvosloja, pod utjecajem monohidratnih fenolnih spojevima u istim koncentracijama u kojima dolazi do inhibicije agregacije i povećanja koncentracije cAMP-a. Srivastava i Dash, (2001) ukazuju da je membrana trombocita značajno veće fluidnosti u bolesnika s moždanim udarom, što bi rezultirati povećanom agregacijom. U prilog interakcije lipofilnih flavonoida i membrane trombocita išle bi utvrđene korelacije molekulskog deskriptora lipofilnosti i *MINaAC* (tablica 9) iako radovi na području povezivanja lipofilnost i propusnosti, a samim time i aktivnosti biomolekula nisu jednoznačni i opisuju drugačije odnose. Wu i sur., (2013) u svojem su istraživanju flavonoida kao inhibitora *E. coli* QSAR modeliranjem, zaključili temeljem jake korelacije između clog*P* i MIC_{50} (minimalna koncentracija tvari koja smanjuje rast mikroorganizama za 50%) da hidrofobnost predstavlja glavnu ulogu u antibakterijskoj aktivnosti flavonoida pretpostavljajući njihovu interakciju s membranom. Druga istraživačka skupina koja se bavila istraživanjem utjecaja flavonoida na *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* su pak promatranjem povezanosti teoretski dobivenih log*P* za flavonoide i njihove antibakterijske aktivnosti zaključili da ove dvije veličine nisu povezane linearno već da je njihova najveća aktivnost vezana za raspon vrijednosti log*P* 2,0-3,3 (Echeverría i sur., 2017). Takav su zaključak donijeli i istraživači u radu na keto-diolima i kiselinama dugolančanih ugljikovodika s potencijalnim kardiovaskularnim djelovanjem u eksperimentima na hepatocitima štakora gdje se također uočen raspon log*P* vrijednosti od 4-7 za spojeve koji su imali najveću biološku aktivnost *in vitro* (Pop i sur., 2004). Nadalje, istraživanja su pokazala da će u uvjetima približne lipofilnosti molekule flavonoida, interakciji s membranom biti skloniji flavanoli što se objašnjava njihovom planarnom konfiguracijom u usporedbi s flavanonima (van Dijk i sur., 2000). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s pretpostavkom da flavonoidi imaju tendenciju da se lokaliziraju u dijelu membranskog dvosloja na temelju njihove lipofilnosti. U tom smislu, flavonoidi s višom lipofilnošću imaju veću sposobnost interakcije s membranskim strukturama, odnosno uzrokuju inhibiciju agregacije trombocita pri nižoj koncentraciji. To bi moglo voditi

smanjenju fluidnosti lipidnog sloja, čime se stabilizira membrana trombocita. Zanimljivo je da log*P* iz *Chemicalize* jedini nije pokazao korelaciju s eksperimentalno R_M parametrom što nas može navesti na zaključak da su izračunati fizikalno-kemijski deskriptori sveobuhvatniji i robustniji kao prediktori lipofilnosti u biološkom okruženju.

5.2 Određivanje *MINaAC* flavanona

Flavanon je u prisustvu svih induktora agregacije (ADP, TRAP-6, kolagen, ristocetin, AA) pokazao inhibicijski učinak (tablica 10) čime ukazuje na neselektivnu prirodu utjecaja na različite puteve aktivacije i agregacije trombocite. Doduše, intenzitet njegova djelovanja nije jednak na svakom od tih putova. Izuzetno niska *MINaAC,* od samo 63 nM, djelotvorna je kada je agregacija potaknuta slabim agonistom ADP-om, odnosno u prisustvu TRAP-6, kao jakog agonista, flavanon postiže značajnu razinu utjecaja na trideset puta većoj koncentraciji od 2 μM. *MINaAC* flavanona kod ADP-om inducirane agregacije je najniža u usporedbi s vrijednostima za druge flavonoide u radu Bojić i sur. (2012). Takvu vrijednost postiže samo 6-hidroksiflavon, ali kod agregacije potaknute ristocetinom. Vaiyapuri i sur. (2015) su u opsežnom istraživanju temeljem odnosa različitih koncentracija nobiletina djelotvornih uz agonist kolagen (6,25 μM) i trombin kao aktivator (50 μM) zaključili kako nobiletin pretežito djeluje na put aktivacije preko GPVI, odnosno u našem istraživanju dalo bi se zaključiti se da je flavanon pretežito djelovao putem G-proteina koji prenosi signale s P2Y12 receptora za ADP u prisustvu kojega je flavanon djelovao u iznimno maloj koncentraciji od 6,25 nM. No treba napomenuti da je u agregacijskim ispitivanjima koje smo proveli (tablica 10) flavanon djelovao u koncentraciji od 0,5 μM na dva različita puta aktivacije; GPIb-IX u slučaju ristocetina, GPVI u slučaju kolagena. U eksperimentu s odabranim flavonoidima koje je slično ovom istraživanju, flavanon je ostvario antiagregacijsko djelovanje u koncentraciji IC_{50} 22 i 58 μM uz AA i kolagen kao induktore agregacije, u usporedbi s flavonom djelovao je u višim koncentracijama ali je bio potentniji u usporedbi s hidroksiliranim derivatima flavona (Landolfi i sur., 1984). Wright i sur. (2013) predlažu da flavanoni uz flavan-3-ole, koji su pokazali najveću sposobnost inhibicije, ostvaruju svoje djelovanje zbog ograničene interakcije s proteinima plazme što im omogućuje povećan pristup intracelularnim kinazama. Osim toga, neplanarna struktura njegovih prstenova ima veći afinitet za trombocitnu membranu. Valja istaknuti da su u tako niskim koncentracijama, koje su postigle antiagregacijski učinak sa slabim agonistom, flavanoni dostupni u krvi nakon unosa hranom. Bogat izvor flavanona predstavljaju

citrusi a njihova zastupljenosti u svakodnevnoj prehrani omogućuje flavanonima postizanje viših koncentracija u plazmi. Tomu vjerojatno pridonosi i karakteristika da se nakon izoflavona i katehina najučinkovitije apsorbiraju. Njihove vršne koncentracije iznose od 0,46±0,07 μM i 1,28±0,13 μM za hesperetin nakon unosa 0,5 i 1 L narančinog soka, a za naringenin nešto niže, 0,20±0,04 μM nakon unosa 1 L soka (Manach i sur. 2003). Erlund i sur. (2001) navode da nakon akutnog unosa vršne koncentracije za naringenin iznose 0,1-1,2 μM nakon unosa narančinog soka, odnosno 0,7 do čak 14,8 μM nakon unosa soka od grejpa te 0,5-5,5 μM hesperetina nakon konzumacije soka od naranče. Ipak, neka istraživanja govore o vrlo niskim koncentracijama izmjerenim nakon unosa konzumacijom uobičajenih količina naranča ili narančinog soka od tek 0,05–0,10 μM (Brett i sur., 2009). Valja napomenuti da su studije o bioraspoloživosti na ljudima većinom mjerile koncentraciju flavonoida u plazmi i urinu zanemarujući metabolite flavonoida, koji se možda akumuliraju u tkivima. Zanimljivo je stoga istraživanje Takumi i sur. (2011) koji su proveli pokus na tkivnoj distribuciji hesperetina u štakoru i otkrili da je njegova najveća koncentracija pronađena u jetri, a druga najviša u aorti. Uzimajući u obzir da se, u rasponima navedenih, nakon unosa hranom, ostvarivih koncentracija flavanona, smješta i *MINaAC* flavanona, nameće se pitanje mogućeg antiagregacijskog djelovanja već samom prehranom. Hubbard i sur. (2006) pokazali su inhibiciju kolagenom potaknute agregacije nakon konzumacije juhe s visokim udjelom kvercetina koje je ostvarila koncentraciju kvercetina u plazmi od 2,59 μM. Isti je autor u drugom eksperimentu pokazao da nakon uzimanja 150 mg i 300 mg doza kvercetin-4'-*O*-beta-*D*-glukozida, koncentracija kvercetina u plazmi doseže vršnu koncentraciju od 4,66 μM i 9,72 μM. U tim koncentracijama kvercetin utječe na funkciju trombocita *in vitro*. Miller i sur. (2014) proveli su istraživanje na skupini od 64 ispitanika s pet različitih testova agregacije i primijetili da ispitanici koji su prije testiranja konzumirali hranu bogatu flavonoidima ostvaruju rezultate koji se razlikuju od rezultata ispitanika koji nisu konzumirali takvu hranu. Utjecaj prirodnih proizvoda na testove funkcije trombocita *in vitro* predstavlja time važno predanalitičko pitanje. Utjecaj flavonoida nakon unosa prehranom, trebao bi se promatrati kao interakcija grupe flavonoida. Eksperimenti impedancijske agregometrije u ovom istraživanju govore u prilog povećanja antiagregacijskog utjecaja nakon inkubacije trombocita s kombinacijom dva flavonoida.

5.3 Povećanje djelovanje *MINaAC* 6-hidroksiflavona i pinocembrin-7-metiletera na agregaciju trombocita u prisustvu *MINaAC* flavanona

U eksperimentima impedancijske agregometrije, 6-hidroksiflavon, predstavnik skupine flavona, u svojoj *MINaAC* ostvaruje statistički značajno povećanje inhibicije u odnosu na mjerenja s DMSO kao negativnom kontrolom, tek u kombinaciji s flavanonom ili pinocembrin-7-metileterom u prisutnosti ADP, TRAP-6 i AA kao agonista agregacije (tablica 11). Za kombinaciju dva flavonoida iz iste skupine (flavanon, pinocembrin-7-metileter) povećanje antiagregacijskog učinka zajedničkim djelovanjem primijećeno je samo uz slab agonist ADP dok je izostalo uz TRAP-6 i kolagen (tablica 11) pa se nameće pitanje da li su kombinacije flavonoida različitih skupina učinkovitije. Wang i sur., (2011), su istraživali antioksidacijsko djelovanje, promatrajući sinergizam, aditivnost ili antagonizam pri interakciji flavonoida kod različitih vrsta namirnica. Opazili su da 13, 68 i 21% kombinacija u istoj grupi namirnica pokazuje sinergističke, aditivne i antagonističke interakcije dok su rezultati za kombinacije različitih kategorija hrane dale 21, 54, i 25% temeljem čega zaključuju da je sinergizam djelovanja flavonoida u većoj mjeri zastupljen kod interakcija između različitih vrsta namirnica. Aditivno ili čak sinergističko djelovanje iste grupe flavonoida objašnjava rezultate djelovanja ekstrakta biljaka. Autori rada na antiagregacijskom učinku ekstrakta *yuzu* citrusa odnosno u njemu najzastupljenijih glikozida naringenina i hesperetina, pokazali su ograničeni učinak na agregaciju potaknutu trombinom, a u slučaju naringina i ADP-om potaknute agregacije, i izostanak učinka. Nasuprot tome ekstrakt *yuzua* pokazao je višestruki inhibicijski efekt neovisno o agonistu (Yu i sur., 2011). Razvijen je i koncept sinergije koji se temelji na ideji da je upotreba cijele biljke koja sadrži grupu spojeva koji zajedno djeluju korisnija od korištenja jednog spoja za postizanje određenog učinka (Malongane i sur., 2017). Ukupno gledajući, kombinacije ispitivanih flavonoida u ovom radu postižu značajno smanjenje agregacije potaknute TRAP-6, ADP i AA, no ne i s kolagenom (tablica 11) iako svaki od njih samostalno postiže statistički značajnu inhibiciju s kolagenom prema rezultatima ovog rada i prema Bojić i sur. (2012). Ovakav različit antiagregacijski učinak kombinacije flavonoida koji je ovisan o vrsti agonista mogao bi se objasniti većom osjetljivošću signalnog puta G-proteina koji koristi aktivacija trombocita potaknuta TRAP-6, ADP i AA na djelovanje flavonoida u odnosu na signalni put aktivacije GPVI i GPI-IXb koji koristi aktivacija posredovana kolagenom.

5.4 Ispitivanje pojačanog djelovanja inhibitora PLC-a, COX-1 i kalcijevih kanala na agregaciju trombocita u prisustvu flavanona

Eksperimenti na kombiniranom inhibicijskom učinku dizajnirani su kako bi ukazali na mogući mehanizam djelovanja flavanona. Za opis interakcije višestrukih inhibitora enzima dostupne su kompleksne jednadžbe. No, ako mehanizam djelovanja nije dobro shvaćen, kao u ovom slučaju za flavonoide, takav pristup nije moguć (Martinez-Irujo i sur., 1998), (Bulusu i sur., 2016). U eksperimentu je korištena visoka koncentracija (30 μM) flavanona u mjerenjima s TRAP-6 kao jakim agonistom, no koncentracija od 3,8 μM korištena u mjerenjima s ADP kao slabim agonistom mogla bi biti ostvariva u plazmi nakon unosa flavanona hranom. Inhibitori enzima i kalcijevih kanala su koncentracijski bili prilagođeni literaturnim podacima o IC_{50} za *in vitro* eksperimente. Indometacin je svojim koncentracijskim vrijednostima u okviru onih koje se postižu uobičajenom terapijom ("TOXNET," 2019) no niti u prisustvu TRAP-6 niti uz ADP i AA nije izmjereno značajno pojačanje njegova antiagregacijskog djelovanja u kombinaciji s flavanonom (slika 18-20) . Koncentracija verapamila, koji se također primjenjuje kao lijek, puno je viša od realnih terapijskih raspona te statistički značajno povećanje inhibicije u prisustvu flavanona nije ostvarivo u fiziološkim uvjetima.

Za razliku od rezultata djelovanja kombinacije 2 flavonoida, kombinacija flavanona i specifičnih inhibitora (U-73122, verapamil, indometacin) dala je nešto drugačije rezultate. U kombinaciji sa specifičnim inhibitorom PLC-a, statistički značajno povećanje djelovanja postiže se uz sve promatrane agoniste: TRAP-6, ADP i kolagen (slika 15, 16, 17). Može se stoga utvrditi da flavanon svoje antiagregacijsko djelovanje ostvaruje inhibicijom PLC neovisno o agonistu. Yang i sur., (2008) ispitali su djelovanje resveratrola (50 μM) u prisutnosti inhibitora U-73122 i agonista TXA_2 receptora U46619, te slično našim rezultatima, dobili značajan aditivan inhibicijski učinak na aktivnost PLC. U istraživanju Wright i sur., (2010) na apigeninu, kvercetinu i katehinu, kvercetin (40 μM) je nakon internalizacije u citoplazmu stanice, pokazao najjače djelovanje; inhibiciju aktivnost Fyn kinaze u cijeloj stanici, te fosforilacije ukupnog proteinskog tirozina Syk kinaze i $PLCy_2$.

Verapamil je imao statistički značajno pojačano djelovanje jedino kada je agregacija bila potaknuta jakim agonistom TRAP-6 (slika 21) što govori u prilog djelovanju flavanona na putu mobilizacije Ca^{2+}. U eksperimentu s verapamilom ne možemo precizno reći da li flavanon ometa ulazak kalcija kroz membranu (L-Lacoste i sur., 1994) ili se radi o inhibiciji vezanja Ca^{2+} na

GPIIb/IIIa receptora (Hjemdahl i Wallén, 1997). U istraživanjima djelovanja flavonoida na agregaciju trombocita redovito je opaženo smanjenje koncentracije intracelularnog Ca^{2+}, no do njega dolazi na kraju signalizacijskog puta aktivacije, i ne govori puno o mehanizmu djelovanja a radovi u kojima se promatrao direktan utjecaj na transport kalcija su malobrojni (Dobrydneva i sur., 1999).

Zanimljivo je da statistički značajan učinak nije bio opažen niti s jednim agonistom za kombinaciju flavanona s inhibitorom enzima COX-1 uz napomenu da uz agonist TRAP-6, i flavanon i indometacin samostalno ostvaruju statistički značajne antiagregacijske učinke koji izostaju kada ih se koristi zajedno (slika 18). Naime, baš kao i za Ca^{2+} u eksperimentima istraživanja antiagregacijskog učinka flavonoida redovito se zapaža i smanjenje koncentracije TXA_2, isto tako krajnjeg rezultata aktivacijske kaskade, no u našem istraživanju taj utjecaj nije prisutan na nivou enzima COX-1. Karlíčková i sur., (2016), tomu u prilog, utvrdili su da nijedan od 29 testiranih najprisutnijih flavonoida ne djeluje na tromboksan sintazu u klinički ostvarivoj koncentraciji, ali mnogi flavonoidi, djeluju kao antagonisti na receptore za tromboksan. Prema rezultatima rada Guerrero i sur. (2007) utjecaj flavonoida nizvodno od sinteze TXA_2 uzrokovan je interferencijama u vezanju TXA_2 na receptor TP na membrani trombocita. Izostanak pojačane inhibicije agregacije u kombinaciji indometacina s flavanonom navodi na zaključak da flavanon ne djeluje na sintezu TXA_2 iz AA, iako se prema rezultatima s kombinacijama flavonoida taj put može smatrati osjetljivim na djelovanje flavonoida. Rezultati ovog dijela istraživanja ukazuju da flavonoidi djeluju vrlo visoko u signalnom putu aktivacije trombocita, npr. inhibicijom PLC. Enzim PLC je središte kojim prolazi mnoštvo signalnih putova (Estevez i Du, 2017) budući aktivacija kolagenom preko transmembranskog GPVI u konačnici aktivira PLCγ, odnosno aktivacija s TRAP-6, ADP-om i TXA_2 preko transmembranskog kompleksa G-proteina dovodi do aktivacije PLCβ. U slučaju gore spomenute pretpostavke da je PLC mjesto djelovanja flavonoida, isti učinak je moguće pretpostaviti ukoliko bi u prijenosu signala postojala interferencija neposredno prije aktivacije PLC. Tada bi mjesto interferencije bili transmembranske signalni kompleksi GPVI i G-proteini; štoviše utjecaj bi se mogao objasniti upravo interferencijom flavonoida u samoj membrani. G-proteini su transmembranski proteinski kompleksi od 7 podjedinica koji su važni za drugu fazu pojačavanja inicijalnog signala i osiguravanja nastanka tromba. Eksperimenti na receptoru vezanom za G protein pokazuju da povećana fluidnost membrane stimulira aktivni oblik receptora (Yoshida i sur., 2019). PLC biva aktivirana preko G-

proteina, a njena aktivacija rezultira formiranjem IP_3 i DAG i posljedičnim povećanjem unutarstanične koncentracije Ca^{2+}. Povećanje koncentracije Ca^{2+} ima važnu ulogu u posredovanju aktivacije $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrina (Offermanns, 2006).

5.5 Praćenje smanjenja aktivacije trombocita metodom protočne citometrije s fluorescentno označenim antitijelima za marker aktivacije integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC-1)

Istraživanje trombocita obuhvaća velik broj metodoloških pristupa među kojima je i protočna citometrija s protutijelima na markere aktivacije od kojih se uobičajeno koristi protutijelo za aktivni oblik integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC-1) i protutijelo za P-selektin. Ovo istraživanje aktivacije trombocita u plazmi bogatoj trombocitima, u prisustvu flavanona i uz agonist TRAP-6 dalo je rezultate u skladu s rezultatima impedancijske agregometrije. Prisutna je statistički značajna korelacija u odnosu primijenjene koncentracije flavanona i smanjenja udjela PAC-1 pozitivnih trombocita (slika 24). Statistička značajnost smanjenja aktivacije trombocita nakon djelovanja flavanona u koncentraciji od 488 μM u odnosu na aktivaciju nakon djelovanja DMSO negativna kontrola ($p=0,0018$) dokazana je na pet ispitanika (slika 25). U odnosu na mjerenja provedena impedancijskom agregometrijom, flavanon je u mjerenjima protočne citometrije postigao značajan utjecaj tek pri relativno visokoj koncentraciji što se može objasniti vrstom uzorka i metodološkim razlikama. Ostertag i sur. (2011) je na uzorcima PRP, optičkom agregometrijom i protočnom citometrijom uočio smanjenje ekspresije P-selektina na trombocitima uz TRAP-6 kao agonist tek pri 100 μM koncentracijama fenolnih spojeva. Vaiyapuri i sur. (2013) primijetili su da se značajnost utjecaj flavonoida tangeretina koncentracijski mijenja obzirom na vrstu uzorka te zaključili da u uzorku opranih trombocita postižu bolje rezultate nego u uzorku PRP objašnjavajući to interakcijom tangeretina s proteinima plazme. Protočna citometrija i agregacija trombocita bilježe različite aspekte funkcije trombocita i stoga nisu metodološki u potpunosti komplementarni kada se promatra reaktivnost trombocita potaknuta agonistom (Gremmel i sur., 2015). Treba naglasiti da metoda impedancijske agregometrija koristi punu krv kao uzorak, što joj omogućava da pod utjecajem i drugih stanica krvi, dakle pod vjerodostojnijim fiziološkim uvjetima, prati agonistom posredovanu agregaciju trombocita (Koltai i sur., 2017). *In vivo* pokusi u kojima se mjeri aktivacija trombocita u ispitanika nakon unosa flavonoida ne dostiže mjerljive utjecaje

metodom protočne citometrije. U istraživanju Schär i sur. (2015) nije dokazano smanjenje aktivacije trombocita kao jednog od faktora kardiovaskularnog rizika na grupi ispitanika 5 sati nakon akutnog uzimanja namirnica bogatih flavanonom pri vršnoj koncentraciji metabolita flavanona od 1,75±0,3 μM. Koncentracija flavanona koja je statistički značajno smanjila aktivaciju integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ u ovom istraživanju, visoka je i neostvariva u *in vivo* uvjetima. Isto se može tvrditi i za koncentracijski niz flavanona koji pokazuje značajnu korelaciju sa smanjenjem ekspresije aktivnog oblika integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Pokusima protočne citometrije potvrđuje se djelovanje flavanona već na nivou aktivacije trombocita. U cirkulirajućim trombocitima, integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ je u relaksiranom obliku, savijene konformacije, s niskim afinitetom za ligande. Pri prelasku neaktivnog oblika u aktivni, poticajem agonista, dolazi do odvajanja transmembranske α i β domene što omogućava proširivanje veznog mjesta u ektodomeni, odnosno stvaranju aktivne forme (Estevez i sur., 2015). Prema pretpostavci temeljem rezultata impedancijske agregometrije, smještaj flavonoida u membranu mogao bi uzrokovati interferencije prilikom konformacijskih promjena integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ i smanjenje aktivne forme, a samim time i smanjenje aktivacije trombocita. Još od 1970tih naovamo brojna su istraživanja pokazala da aktivaciji stanica pa tako i trombocita (aktivacija PLC-a, aktivacija PKC-a, oslobađanje AA itd.) pridonose reakcije fosfolipida smještenih u unutrašnjem sloju membrane (Lhermusier i sur., 2011). Već devedesetih godina prošlog stoljeća istraživanje sa esterom ciklopropil masne kiseline utvrdilo je da aktivnost trombocita smanjena povećanjem fluidnosti membrane što znači da je fluidnost membrane uključena u regulaciju aktivacije trombocita (Vlašic i sur., 1993). Furusawa i sur. (2003) su istraživali antiagregacijski utjecaj derivata kvercetina iz ekstrakta lupina luka na modelu liposoma. Fluorescentnom polarizacijom na modelu liposoma utvrdili su povećanje stabilnosti membrane rigidifikacijom, i to prvenstveno temeljem interakcija flavonoida u dubljim, lipofilnijm dijelovima membrane. Tsuchiya i Iinuma, (2000) su ispitivali antibakterijska svojstva soforaflavanona i zaključili da se ona temelje na destabilizaciji membrane bakterija do koje dolazi interakcijom s flavonoidom i u lipidnom dvosloju i na vanjskoj granici, dok Arora i sur. (2000) zaključuje da upravo smještanje u lipidnu srž membrane uzrokuje dramatično smanjenje fluidnosti membrane. S tim nije u skladu istraživanje osjetljivom metodom NMR-a gdje je za flavona, krizin, luteolin, miricetin i luteolin-7-glukozid potvrđen njihov smještaj u membrani, s lipofilnijim flavanonom smještenim dublje u lipidnom dvosloju, za koje niti pri visokim koncentracijama nije uočen utjecaj na strukturu membrane (Scheidt i sur., 2004) .

6 ZAKLJUČCI

Dugogodišnji interes istraživačke zajednice za ispitivanjem mehanizma opaženih blagotvornih svojstava flavonoida ne jenjava. Jedno od najzanimljivijih je antiagregacijsko djelovanje flavonoida jer se nameće kao moguća opcija dodatne terapije postojećoj, konvencionalnoj koja je nedovoljno učinkovita, a uz to, uzrokuje ozbiljne nuspojave, kao što je krvarenje u gastrointestinalnom traktu.

Ispitivanje sveobuhvatnosti djelovanja flavonoida provedeno je metodom impedancijske agregometrije. Flavanon pojačava inhibicijsko djelovanje U-73122 na enzim PLC, smješten vrlo visoko u signalnom putu aktivacije trombocita uz sve ispitivane agoniste agregacije: TRAP-6, ADP i kolagen. Pojačanje inhibicije Ca^{2+}-kanala verapamilom uz flavanon, opaženo je samo u prisutnosti TRAP-6, dok je pojačanje inhibicijskog djelovanja indometacina u prisustvu flavanona u potpunosti izostalo, neovisno na koji je put aktivacije djelovanje bilo usmjereno. Kad se pak ispitivalo djelovanje kombinacije flavanona i 6-hidroksiflavon, flavanona i pinocembrin-7-metileter, 6-hidroksiflavon i pinocembrin-7-metileter, opaženo je značajno smanjenje agregacije trombocita uz sve agoniste TRAP-6, ADP, AA osim kolagena. Inhibicijski utjecaj flavanona na različite puteve aktivacije trombocita govori u prilog sveobuhvatnosti djelovanja koje se temelji na inhibicijskom utjecaju flavanona na enzim PLC, smješten vrlo visoko u signalizacijskom putu.

Membrana trombocita izuzetno je važna za aktivaciju trombocita mehanizmom *outside-in* i *in side-out* signalizacije. Utjecaj flavanona na membranu trombocita mjeren je metodom protočne citometrije uz korištenje specifičnih protutijela za aktivirani oblik integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na koji se vežu fibrinogen i VWF čime se potiče agregacija trombocita: Rezultati ukazuju da je inkubacija trombocita s flavanonom uzrokovala smanjenje aktivacije trombocita odnosno smanjenje ekspozicije aktivne konformacije integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ na membrani trombocita. Interakciji flavanona s membranom pridonosi njegova lipofilnost na što upućuje negativna korelacija računskih vrijednosti logaritma koeficijenta razdijeljenja s minimalnim koncentracijama flavonoida potrebnim za statistički značajno smanjenje agregacije, iz čega proizlazi da lipofilniji flavonoid ostvaruje inhibitorni učinak pri nižim koncentracijama.

Flavanon ostvaruje minimalni antiagregacijski učinak sa svim agonistima u koncentracijama ostvarivim kroz prehranu, a uzevši u obzir pojačano djelovanje kombinacije flavonoida na inhibiciju agregacije može se zaključiti da je u uvjetima raznolike prehrane moguć inhibicijski utjecaj na agregaciju trombocita.

Parametri lipofilnosti flavonoida i sveobuhvatnost mehanizam njihovog djelovanja čini flavonoide dobrim kandidatima za potpornu antiagregacijsku terapiju kao i za prevenciju u stanjima hipeagregabilnosti.

Daljnja istraživanja antiagregacijskog djelovanja flavonoida trebala bi ići u smjeru dubljeg istraživanja njihove biološke raspoloživosti, aktivnosti njihovih metabolita te interakcije s proteinima i drugim biološkim molekulama.

7 POPIS KRATICA I SIMBOLA

5HT	5 - hidroksitriptofan
AA	engl**.** *arachidonic acid***,** arahidonska kiselina
ADME	apsorbcija**,** distribucija, metabolizam, ekskrecija
ADMET	apsorbcija**,** distribucija, metabolizam, ekskrecija, toksičnost
ADP	adenozin-difosfat
AU	engl. *arbitrary units,* proizvoljna jedinica
AUC	engl. *Area Under a Curve*, površina ispod krivulje
cAMP	ciklički adenozim-monofosfat
CD	engl. *cluster of differentiation,* biljeg diferencijacije
COX-1	ciklooksigenaza-1
CYP2C19	engl. *cytochrome P450 2C19,* citokrom P450 2C19
DAG	diacilglicerol
DDK	dobrovoljni davatelji krvi
DMSO	dimetilsulfoksid
FITC	engl**.** *fluorescein isothiocyanate,* fluorescein izotiocijanat
FSC	engl**.** *forward scatter,*okomito raspršenje
GP	glikoprotein
IC_{50}	engl. *half maximal inhibitory concentration,* koncentracija koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju danoga parametra
Ig	imunoglobulin
IP_3	inozitol-1,4,5-trifosfat
ITAM	engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif,* aktivacijski motiv temeljen na tirozinu
IUPAC	engl. *International Union for Pure and Applied Chemistry*, međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju
KVB	kardiovaskularne bolesti
LDL	engl. *low densitiy lipoprotein*, lipoproteini niske gustoće
MFI	engl. *mean flourescence intensity,* srednja vrijednost jačine fluorescencije
MIC_{50}	engl. *minimal inhibitory concentration,* minimalna koncentracija koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju rasta bakterija
MINaAC	engl. *minimal antiaggregatory concentration,* minimalna antiagregacijska koncentracija
OAK	oralni antikoagulantki
OECD	engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development,* organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj
P	koeficijent razdjeljenja
PAR	proteinazom aktivirani receptori
PE	engl. *phycoerythrin,* fikoeritrin
PF4	engl**. p***latelet factor 4*, trombocitni čimbenik 4
PIP_2	fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat
PKC	protein-kinaza C
PLA_2	engl. *phosholipase A_2,* fosfolipaza A_2
PLC	engl. *phospholipase C,* fosfolipaza C
PRP	engl**.** *platelet rich plasma,* plazma bogata trombocitima
QSAR	engl. q*uantitative structure-activitiy relationship,* kvantitativna povezanost strukture i aktivnosti

R_F	čimbenik zadržavanja
R_M	kromatografski parametar
ROS	engl. *reactive oxygen species,* reaktivni kisikovi spojevi
RP-HPLC	engl. *reverse phase high performance liquid chromatography*, obrnuto fazna tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
RP-TLC	engl**.** *reverse phase thin layer chromatography,* obrnuto fazna tankoslojna kromatografija
SAD	Sjedinjene Američke Države
SAR	engl.s*Structure-activity relationship,* odnos strukture i aktivnosti
SBP	engl. *sistolic blood pressure*, sistolički krvni tlak
SSC	engl. *side scatter*
TP	receptor za tromboksan A_2
TRAP-6	engl. t*hrombin receptor activator peptide 6,* peptid 6 koji aktivira receptor za trombin
TXA_2	tromboksan A_2
UV	engl. *ultraviolet,* ultraljubičasto
VWF	engl. *von Willebrand factor*, von Willebrandov čimbenik

8 LITERATURA

Agbani, E.O. & Poole, A.W. (2017). Procoagulant platelets: generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood*, **130**, 2171–2179.

Aherne, S.A. & O'Brien, N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **18**, 75–81.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. & Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, **262**, 5592–5595.

Angiolillo, D.J. (2012). The evolution of antiplatelet therapy in the treatment of acute coronary syndromes: from aspirin to the present day. *Drugs*, **72**, 2087–2116.

Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G. & Strasburg, G.M. (2000). Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **373**, 102–109.

Barzanti, C., Evans, R., Fouquet, J., Gouzin, L., Howarth, N.M., Kean, G., Levet, E., Wang, D., Wayemberg, E., Yeboah, A.A. & Kraft, A. (2007). Potentiometric determination of octanol–water and liposome–water partition coefficients (logP) of ionizable organic compounds. *Tetrahedron Letters*, **48**, 3337–3341.

Bate-Smith, E.C. & Westall, R.G. (1950). Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occuring phenolic substances. *Biochimica et Biophysica Acta*, **4**, 427–440.

Bennion, B.J., Be, N.A., McNerney, M.W., Lao, V., Carlson, E.M., Valdez, C.A., Malfatti, M.A., Enright, H.A., Nguyen, T.H., Lightstone, F.C. & Carpenter, T.S. (2017). Predicting a Drug's Membrane Permeability: A Computational Model Validated With in Vitro Permeability Assay Data. *The Journal of Physical Chemistry. B*, **121**, 5228–5237.

Bhatt, D.L. & Topol, E.J. (2003). Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, **2**, 15–28.

Biagi, G.L., Barbaro, A.M., Gandolfi, O., Guerra, M.C. & Cantelli-Forti, G. (1975). Rm values of steroids as an expression of their lipophilic character in structure-activity studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, **18**, 873–883.

Bijak, M., Sut, A., Kosiorek, A., Saluk-Bijak, J. & Golanski, J. (2019). Dual Anticoagulant/Antiplatelet Activity of Polyphenolic Grape Seeds Extract. *Nutrients*, **11**.

Blausen.com staff & staff, B. com. (2014). Medical gallery of Blausen Medical 2014. *WikiJournal of Medicine*, **1**, 10.

Bober, K., Bębenek, E. & Boryczka, S. (2019). Application of TLC for Evaluation of the Lipophilicity of Newly Synthetized Esters: Betulin Derivatives. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2019**, 1297659.

Bojić, M., Debeljak, Ž., Medić-Šarić, M. & Tomičić, M. (2012). Interference of selected flavonoid aglycons in platelet aggregation assays. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **50**, 1403–1408.

Bojić, M., Debeljak, Z., Tomičić, M., Medić-Šarić, M. & Tomić, S. (2011). Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutrition Journal*, **10**, 73.

Börsch-Haubold, A.G., Kramer, R.M. & Watson, S.P. (1997). Phosphorylation and Activation of Cytosolic Phospholipase A2 by 38-kDa Mitogen-Activated Protein Kinase in Collagen-Stimulated Human Platelets. *European Journal of Biochemistry*, **245**, 751–759.

Brett, G.M., Hollands, W., Needs, P.W., Teucher, B., Dainty, J.R., Davis, B.D., Brodbelt, J.S. & Kroon, P.A. (2009). Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. *The British Journal of Nutrition*, **101**, 664–675.

Brocchieri, A., Pacchiarini, L., Saporiti, A. & Grignani, G. (1995). In vitro Effect of Verapamil on Platelet Activation Induced by ADP, Collagen or Thrombin. *Platelets*, **6**, 195–199.

Brower, V. (1998). Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market? *Nature Biotechnology*, **16**, 728.

Bulusu, K.C., Guha, R., Mason, D.J., Lewis, R.P.I., Muratov, E., Kalantar Motamedi, Y., Cokol, M. & Bender, A. (2016). Modelling of compound combination effects and applications to efficacy and toxicity: state-of-the-art, challenges and perspectives. *Drug Discovery Today*, **21**, 225–238.

Bye, A.P., Unsworth, A.J. & Gibbins, J.M. (2016). Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, **14**, 918–930.

Cardinal, D.C. & Flower, R.J. (1980). The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *Journal of Pharmacological Methods*, **3**, 135–158.

Cassidy, A., Hanley, B. & Lamuela-Raventos, R.M. (2000). Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 1044–1062.

Castells, R.C. (2004). Determination of gas–liquid partition coefficients by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, Estimation of Physicochemical Properties by Chromatographic and Electrophoretic Techniques, **1037**, 223–231.

Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y. & Ozer, N.K. (2012a). Resveratrol: French Paradox Revisited. *Frontiers in Pharmacology*, **3**.

Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y. & Ozer, N.K. (2012b). Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in Pharmacology*, **3**, 141.

Chemistry, I.U. of P. and A. (2019). IUPAC Gold Book - lipophilicity [Internet document] URL http://goldbook.iupac.org/html/L/LT06965.html. Accessed 04/05/2019.

Chen, C., Yang, F.-Q., Zhang, Q., Wang, F.-Q., Hu, Y.-J. & Xia, Z.-N. (2015). Natural Products for Antithrombosis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, **2015**, 876426.

Corvazier, E. & Maclouf, J. (1985). Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, **835**, 315–321.

Coughlin, S.R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **3**, 1800–1814.

Daina, A., Michielin, O. & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, **7**, 42717.

Davì, G. & Patrono, C. (2007). Platelet Activation and Atherothrombosis. *New England Journal of Medicine*, **357**, 2482–2494.

Davies, J.M.S., Cillard, J., Friguet, B., Cadenas, E., Cadet, J., Cayce, R., Fishmann, A., Liao, D., Bulteau, A.-L., Derbré, F., Rébillard, A., Burstein, S., Hirsch, E., Kloner, R.A., Jakowec, M., Petzinger, G., Sauce, D., Sennlaub, F., Limon, I., Ursini, F., Maiorino, M., Economides, C., Pike, C.J., Cohen, P., Salvayre, A.N., Halliday, M.R., Lundquist, A.J., Jakowec, N.A., Mechta-Grigoriou, F., Mericskay, M., Mariani, J., Li, Z., Huang, D., Grant, E., Forman, H.J., Finch, C.E., Sun, P.Y., Pomatto, L.C.D., Agbulut, O., Warburton, D., Neri, C., Rouis, M., Cillard, P., Capeau, J., Rosenbaum, J. & Davies, K.J.A. (2017). The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. *GeroScience*, **39**, 499–550.

Davis, E.M., Knezevich, J.T. & Teply, R.M. (2013). Advances in antiplatelet technologies to improve cardiovascular disease morbidity and mortality: a review of ticagrelor. *Clinical Pharmacology : Advances and Applications*, **5**, 67–83.

Dijk, C. van, Driessen, A.J. & Recourt, K. (2000). The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles. *Biochemical Pharmacology*, **60**, 1593–1600.

Dobrydneva, Y., Williams, R.L. & Blackmore, P.F. (1999). *trans* -Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *British Journal of Pharmacology*, **128**, 149–157.

Dutta-Roy, A.K., Gordon, M.J., Kelly, C., Hunter, K., Crosbie, L., Knight-Carpentar, T. & Williams, B.C. (1999). Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on human platelet aggregation. *Platelets*, **10**, 298–305.

Echeverría, J., Opazo, J., Mendoza, L., Urzúa, A. & Wilkens, M. (2017). Structure-Activity and Lipophilicity Relationships of Selected Antibacterial Natural Flavones and Flavanones of Chilean Flora. *Molecules*, **22**, 608.

El Haouari, M. & Rosado, J.A. (2009). Platelet function in hypertension. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **42**, 38–43.

El Haouari, M. & Rosado, J.A. (2016). Medicinal Plants with Antiplatelet Activity: Medicinal Plants with Antiplatelet Activity. *Phytotherapy Research*, **30**, 1059–1071.

Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, **24**, 851–874.

Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G. & Aro, A. (2001). Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *The Journal of Nutrition*, **131**, 235–241.

Estevez, B. & Du, X. (2017). New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology*, **32**, 162–177.

Estevez, B., Shen, B. & Du, X. (2015). Targeting integrin and integrin signaling in treating thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **35**, 24–29.

Faggio, C., Sureda, A., Morabito, S., Sanches-Silva, A., Mocan, A., Nabavi, S.F. & Nabavi, S.M. (2017). Flavonoids and platelet aggregation: A brief review. *European Journal of Pharmacology*, **807**, 91–101.

Fernandes, I., Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N. & Freitas, V. de. (2017). Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules*, **22**, 292.

Furusawa, M., Tsuchiya, H., Nagayama, M., Tanaka, T., Nakaya, K. & Iinuma, M. (2003). Anti-Platelet and Membrane-Rigidifying Flavonoids in Brownish Scale of Onion. *Journal of Health Science*, **49**, 475–480.

Gandhi, Y.A. & Morris, M.E. (2009). Structure-activity relationships and quantitative structure-activity relationships for breast cancer resistance protein (ABCG2). *The AAPS journal*, **11**, 541–552.

Goetz, M.E., Judd, S.E., Hartman, T.J., McClellan, W., Anderson, A. & Vaccarino, V. (2016). Flavanone Intake Is Inversely Associated with Risk of Incident Ischemic Stroke in the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke (REGARDS) Study1234. *The Journal of Nutrition*, **146**, 2233–2243.

Golwala, H.B., Cannon, C.P., Steg, P.G., Doros, G., Qamar, A., Ellis, S.G., Oldgren, J., Berg, J.M. ten, Kimura, T., Hohnloser, S.H., Lip, G.Y.H. & Bhatt, D.L. (2018). Safety and efficacy of dual vs. triple antithrombotic therapy in patients with atrial fibrillation

following percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *European Heart Journal*, **39**, 1726–1735a.

González-Gallego, J., Sánchez-Campos, S. & Tuñón, M.J. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricion Hospitalaria*, **22**, 287–293.

Gremmel, T., Koppensteiner, R. & Panzer, S. (2015). Comparison of Aggregometry with Flow Cytometry for the Assessment of Agonists´-Induced Platelet Reactivity in Patients on Dual Antiplatelet Therapy. *PloS One*, **10**, e0129666.

Gremmel, T. & Panzer, S. (2017). Oral antiplatelet therapy: impact for transfusion medicine. *Vox Sanguinis*, **112**, 511–517.

Guerrero, J.A., Lozano, M.L., Castillo, J., Benavente-García, O., Vicente, V. & Rivera, J. (2005). Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **3**, 369–376.

Guerrero, J.A., Navarro-Nuñez, L., Lozano, M.L., Martínez, C., Vicente, V., Gibbins, J.M. & Rivera, J. (2007). Flavonoids inhibit the platelet TxA(2) signalling pathway and antagonize TxA(2) receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **64**, 133–144.

Guo, Y., Mah, E., Davis, C.G., Jalili, T., Ferruzzi, M.G., Chun, O.K. & Bruno, R.S. (2013). Dietary fat increases quercetin bioavailability in overweight adults. *Molecular Nutrition & Food Research*, **57**, 896–905.

Hansch, Corwin. & Fujita, Toshio. (1964). p-σ-π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, **86**, 1616–1626.

Heemskerk, J.W., Farndale, R.W. & Sage, S.O. (1997). Effects of U73122 and U73343 on human platelet calcium signalling and protein tyrosine phosphorylation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1355**, 81–88.

Hendrich, A.B. (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica*, **27**, 27–40.

Hendrich, A.B., Malon, R., Pola, A., Shirataki, Y., Motohashi, N. & Michalak, K. (2002). Differential interaction of Sophora isoflavonoids with lipid bilayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**, 201–208.

Hernández-Aquino, E. & Muriel, P. (2018). Beneficial effects of naringenin in liver diseases: Molecular mechanisms. *World Journal of Gastroenterology*, **24**, 1679–1707.

Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. & Putte, Betty. van de. (1993). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **41**, 1242–1246.

Hjemdahl, P. & Wallén, N.H. (1997). Calcium antagonist treatment, sympathetic activity and platelet function. *European Heart Journal*, **18 Suppl A**, A36-50.

Hubbard, G.P., Wolffram, S., Vos, R. de, Bovy, A., Gibbins, J.M. & Lovegrove, J.A. (2006). Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *The British Journal of Nutrition*, **96**, 482–488.

Kaliszan, R., Haber, P., Baczek, T., Siluk, D. & Valko, K. (2002). Lipophilicity and pKa estimates from gradient high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, **965**, 117–127.

Karlíčková, J., Říha, M., Filipský, T., Macáková, K., Hrdina, R. & Mladěnka, P. (2016). Antiplatelet Effects of Flavonoids Mediated by Inhibition of Arachidonic Acid Based Pathway. *Planta Medica*, **82**, 76–83.

Kasperkiewicz, K., Ponczek, M.B. & Budzisz, E. (2018). A biological, fluorescence and computational examination of synthetic coumarin derivatives with antithrombotic potential. *Pharmacological Reports*, **70**, 1057–1064.

Keihanian, F., Saeidinia, A., Bagheri, R.K., Johnston, T.P. & Sahebkar, A. (2018). Curcumin, hemostasis, thrombosis, and coagulation. *Journal of Cellular Physiology*, **233**, 4497–4511.

Kitagawa, S., Orinaka, M. & Hirata, H. (1993). Depth-dependent change in membrane fluidity by phenolic compounds in bovine platelets and its relationship with their effects on aggregation and adenylate cyclase activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1179**, 277–282.

Kłosińska-Szmurło, E., Pluciński, F.A., Grudzień, M., Betlejewska-Kielak, K., Biernacka, J. & Mazurek, A.P. (2014). Experimental and theoretical studies on the molecular properties of ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin in determining bioavailability. *Journal of Biological Physics*, **40**, 335–345.

Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. & Maatela, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *British Medical Journal*, **312**, 478–481.

Kokubo, Y., Iso, H., Ishihara, J., Okada, K., Inoue, M. & Tsugane, S. (2007). Association of Dietary Intake of Soy, Beans, and Isoflavones With Risk of Cerebral and Myocardial Infarctions in Japanese Populations: The Japan Public Health Center–Based (JPHC) Study Cohort I. *Circulation*, **116**, 2553–2562.

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

Koupenova, M., Kehrel, B.E., Corkrey, H.A. & Freedman, J.E. (2017). Thrombosis and platelets: an update. *European Heart Journal*, **38**, 785–791.

Krogholm, K.S., Bredsdorff, L., Knuthsen, P., Haraldsdóttir, J. & Rasmussen, S.E. (2010). Relative bioavailability of the flavonoids quercetin, hesperetin and naringenin given simultaneously through diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, **64**, 432–435.

Kujawski, J., Popielarska, H., Myka, A., Drabińska, B. & Bernard, M. (2012). The log P Parameter as a Molecular Descriptor in the Computer-aided Drug Design – an Overview. *Computational Methods in Science and Technology*, **18**, 81–88.

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

Lall, R.K., Adhami, V.M. & Mukhtar, H. (2016). Dietary flavonoid fisetin for cancer prevention and treatment. *Molecular Nutrition & Food Research*, **60**, 1396–1405.

Landolfi, R., Mower, R.L. & Steiner, M. (1984). Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochemical Pharmacology*, **33**, 1525–1530.

Leo, A., Hansch, C. & Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*, **71**, 525–616.

Leo, A., Jow, P.Y., Silipo, C. & Hansch, C. (1975). Calculation of hydrophobic constant (log P) from pi and f constants. *Journal of Medicinal Chemistry*, **18**, 865–868.

Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E.P., Ambriz-Perez, D.L. & Heredia, J.B. (2016). Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**.

Lhermusier, T., Chap, H. & Payrastre, B. (2011). Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **9**, 1883–1891.

Li, Z., Delaney, M.K., O'Brien, K.A. & Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **30**, 2341–2349.

Lindahl, M. & Tagesson, C. (1997). Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation*, **21**, 347–356.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W. & Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **46**, 3–26.

L-Lacoste, L., Lam, J.Y., Hung, J. & Waters, D. (1994). Oral verapamil inhibits platelet thrombus formation in humans. *Circulation*, **89**, 630–634.

Lombardo, F., Shalaeva, M.Y., Tupper, K.A., Gao, F. & Abraham, M.H. (2000). ElogPoct: A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, 2922–2928.

Malongane, F., McGaw, L.J. & Mudau, F.N. (2017). The synergistic potential of various teas, herbs and therapeutic drugs in health improvement: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **97**, 4679–4689.

Manach, C., Morand, C., Gil-Izquierdo, A., Bouteloup-Demange, C. & Rémésy, C. (2003). Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition*, **57**, 235–242.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81**, 230S-242S.

Martinez-Irujo, J.J., Villahermosa, M.L., Mercapide, J., Cabodevilla, J.F. & Santiago, E. (1998). Analysis of the combined effect of two linear inhibitors on a single enzyme. *Biochemical Journal*, **329**, 689–698.

McKinney, J.D., Richard, A., Waller, C., Newman, M.C. & Gerberick, F. (2000). The practice of structure activity relationships (SAR) in toxicology. *Toxicological Sciences*, **56**, 8–17.

Middleton, E. (1998). Effect of Plant Flavonoids on Immune and Inflammatory Cell Function. In: *Flavonoids in the Living System*, Advances in Experimental Medicine and Biology (edited by J.A. Manthey & B.S. Buslig). Pp. 175–182. Boston, MA: Springer US.

Miller, C.H., Rice, A.S., Garrett, K. & Stein, S.F. (2014). Gender, race and diet affect platelet function tests in normal subjects, contributing to a high rate of abnormal results. *British Journal of Haematology*, **165**, 842–853.

Mink, P.J., Scrafford, C.G., Barraj, L.M., Harnack, L., Hong, C.-P., Nettleton, J.A. & Jacobs, D.R. (2007). Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **85**, 895–909.

Miyake, Y., Shimoi, K., Kumazawa, S., Yamamoto, K., Kinae, N. & Osawa, T. (2000). Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3217–3224.

Mladěnka, P., Zatloukalová, L., Filipský, T. & Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, **49**, 963–975.

Mlcek, J., Jurikova, T., Skrovankova, S. & Sochor, J. (2016). Quercetin and Its Anti-Allergic Immune Response. *Molecules*, **21**.

Mohd Nor, N.H., Othman, F., Mohd Tohit, E.R. & Md Noor, S. (2016). Medicinal Herbals with Antiplatelet Properties Benefit in Coronary Atherothrombotic Diseases. *Thrombosis*, **2016**.

Montalescot, G. & Sabatine, M.S. (2016). Oral dual antiplatelet therapy: what have we learnt from recent trials? *European Heart Journal*, **37**, 344–352.

Moroi, M. & Jung, S.M. (2004). Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thrombosis Research*, **114**, 221–233.

Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M. & Terao, J. (2002). Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *The Journal of Nutrition*, **132**, 1956–1961.

Navarro-Núñez, L., Lozano, M.L., Palomo, M., Martínez, C., Vicente, V., Castillo, J., Benavente-García, O., Diaz-Ricart, M., Escolar, G. & Rivera, J. (2008). Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2970–2976.

Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., Chaffaut, L. du, Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D. & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, **2010**.

Offermanns, S. (2006). Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circulation Research*, **99**, 1293–1304.

Oldham, W.M. & Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **9**, 60–71.

Oliveira Filho, A.A., Fernandes, H.M.B., Assis, T.J.C.F., Meireles, D.R.P., Edeltrudes, O., Lima, E.O. & Pêssoa, H.L.F. (2015). Pharmacological and toxicological analysis of flavonoid 5,7,4'-trimethoxyflavone: An in silico approach. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, **7**, 431–434.

Ollila, F., Halling, K., Vuorela, P., Vuorela, H. & Slotte, J.P. (2002). Characterization of Flavonoid–Biomembrane Interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **399**, 103–108.

Olsen, H., Aaby, K. & Borge, G.I.A. (2009). Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (Brassica oleracea L. Convar. acephala Var. sabellica) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 2816–2825.

Ostertag, L.M., O'Kennedy, N., Horgan, G.W., Kroon, P.A., Duthie, G.G. & Roos, B. de. (2011). In vitro anti-platelet effects of simple plant-derived phenolic compounds are only found at high, non-physiological concentrations. *Molecular Nutrition & Food Research*, **55**, 1624–1636.

Panche, A., Diwan, A. & R. Chandra, S. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, **5**.

Patrono, C. (1994). Aspirin as an Antiplatelet Drug. *New England Journal of Medicine*, **330**, 1287–1294.

Pereira-Caro, G., Borges, G., Hooft, J. van der, Clifford, M.N., Del Rio, D., Lean, M.E.J., Roberts, S.A., Kellerhals, M.B. & Crozier, A. (2014). Orange juice (poly)phenols are highly bioavailable in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **100**, 1378–1384.

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F. & Scalbert, A. (2010). Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 4959–4969.

Peterson, J.J., Dwyer, J.T., Jacques, P.F. & McCullough, M.L. (2012). Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutrition Reviews*, **70**, 491–508.

Pignatelli, P., Pulcinelli, F.M., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A., Gazzaniga, P.P. & Violi, F. (2000). The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **72**, 1150–1155.

Pool, H., Mendoza, S., Xiao, H. & McClements, D.J. (2013). Encapsulation and release of hydrophobic bioactive components in nanoemulsion-based delivery systems: impact of physical form on quercetin bioaccessibility. *Food & Function*, **4**, 162–174.

Pop, E., Oniciu, D.C., Pape, M.E., Cramer, C.T. & Dasseux, J.-L.H. (2004). Lipophilicity Parameters and Biological Activity in a Series of Compounds with Potential Cardiovascular Applications. *Croatica Chemica Acta*, **77**, 301–306.

Pyka, A., Babuśka, M. & Zachariasz, M. (2006). A comparison of theoretical methods of calculation of partition coefficients for selected drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **63**, 159–167.

Rabtti, E.H.M.A., Natic, M.M., Milojkovic-Opsenica, D.M., Trifkovic, J.Đ., Vuckovic, I.M., Vajs, V.E. & Tešic, □ivoslav Lj. (2012). RP TLC-based lipophilicity assessment of some natural and synthetic coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **23**, 522–530.

Rao, G.H. & White, J.G. (1985). Disaggregation and reaggregation of "irreversibly" aggregated platelets: a method for more complete evaluation of anti-platelet drugs. *Agents and Actions*, **16**, 425–434.

Rasines-Perea, Z. & Teissedre, P.-L. (2017). Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules*, **22**.

Ravishankar, D., Salamah, M., Akimbaev, A., Williams, H.F., Albadawi, D.A.I., Vaiyapuri, R., Greco, F., Osborn, H.M.I. & Vaiyapuri, S. (2018). Impact of specific functional groups in flavonoids on the modulation of platelet activation. *Scientific Reports*, **8**.

Renaud, S. & Lorgeril, M. de. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, **339**, 1523–1526.

Ringleb Peter A. (2006). Thrombolytics, Anticoagulants, and Antiplatelet Agents. *Stroke*, **37**, 312–313.

Ro, J.-Y., Ryu, J.-H., Park, H.-J. & Cho, H.-J. (2015). Onion (Allium cepa L.) peel extract has anti-platelet effects in rat platelets. *SpringerPlus*, **4**, 17.

Rossino, M.G. & Casini, G. (2019). Nutraceuticals for the Treatment of Diabetic Retinopathy. *Nutrients*, **11**, 771.

Rothwell, J.A., Day, A.J. & Morgan, M.R.A. (2005). Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4355–4360.

Rutkowska, E., Pajak, K. & Jóźwiak, K. (2013). Lipophilicity--methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **70**, 3–18.

Saeed, S.A., Rasheed, H., Fecto, F.A.W., Achakzai, M.I., Ali, R., Connor, J.D. & Gilani, A.-H. (2004). Signaling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets. *Acta Pharmacologica Sinica*, **25**, 887–892.

Saghaie, L. & Mostafavi, R.C.H.S.A. (2003). Comparison of Automated Continuous Flow Method With Shake- Flask Method in Determining Partition Coefficients of Bidentate Hydroxypyridinone Ligands. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **11**, 38–46.

Sak, K. (2017). Intake of Individual Flavonoids and Risk of Carcinogenesis: Overview of Epidemiological Evidence. *Nutrition and Cancer*, **69**, 1119–1150.

Scarborough, H. (1945). Observations on the nature of vitamin P and the vitamin P potency of certain foodstuffs. *Biochemical Journal*, **39**, 271–278.

Schär, M.Y., Curtis, P.J., Hazim, S., Ostertag, L.M., Kay, C.D., Potter, J.F. & Cassidy, A. (2015). Orange juice-derived flavanone and phenolic metabolites do not acutely affect cardiovascular risk biomarkers: a randomized, placebo-controlled, crossover trial in men at moderate risk of cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **101**, 931–938.

Scheidt, H.A., Pampel, A., Nissler, L., Gebhardt, R. & Huster, D. (2004). Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1663**, 97–107.

Serafini, M., Peluso, I. & Raguzzini, A. (2010). Flavonoids as anti-inflammatory agents. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **69**, 273–278.

Shichijo, M., Yamamoto, N., Tsujishita, H., Kimata, M., Nagai, H. & Kokubo, T. (2003). Inhibition of syk activity and degranulation of human mast cells by flavonoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **26**, 1685–1690.

Srivastava, K. & Dash, D. (2001). Altered membrane fluidity and signal transduction in the platelets from patients of thrombotic stroke. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **224**, 143–149.

Stoica, C.I., Ionuț, I., Vlase, L., Tiperciuc, B., Marc, G., Oniga, S., Araniciu, C. & Oniga, O. (2018). Lipophilicity evaluation of some thiazolyl-1,3,4-oxadiazole derivatives with antifungal activity. *Biomedical Chromatography*, **32**, e4221.

Stylos, E., Chatziathanasiadou, M.V., Tsiailanis, A., Kellici, T.F., Tsoumani, M., Kostagianni, A.D., Deligianni, M., Tselepis, A.D. & Tzakos, A.G. (2017). Tailoring naringenin conjugates with amplified and triple antiplatelet activity profile: Rational design, synthesis, human plasma stability and in vitro evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1861**, 2609–2618.

Takumi, H., Mukai, R., Ishiduka, S., Kometani, T. & Terao, J. (2011). Tissue distribution of hesperetin in rats after a dietary intake. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **75**, 1608–1610.

Tammela, P., Laitinen, L., Galkin, A., Wennberg, T., Heczko, R., Vuorela, H., Slotte, J.P. & Vuorela, P. (2004). Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **425**, 193–199.

Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method [Internet document] . (2019). URL https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-117-partition-coefficient-n-octanol-water-hplc-method_9789264069824-en. Accessed 04/05/2019.

Testai, L. & Calderone, V. (2017). Nutraceutical Value of Citrus Flavanones and Their Implications in Cardiovascular Disease. *Nutrients*, **9**, 502.

Thilakarathna, S.H. & Rupasinghe, H.P.V. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, **5**, 3367–3387.

Thomas, D.W., Mannon, R.B., Mannon, P.J., Latour, A., Oliver, J.A., Hoffman, M., Smithies, O., Koller, B.H. & Coffman, T.M. (1998). Coagulation defects and altered hemodynamic responses in mice lacking receptors for thromboxane A2. *Journal of Clinical Investigation*, **102**, 1994–2001.

Tian, X., Chang, L., Ma, G., Wang, T., Lv, M., Wang, Z., Chen, L., Wang, Y., Gao, X. & Zhu, Y. (2016). Delineation of Platelet Activation Pathway of Scutellarein Revealed Its

Intracellular Target as Protein Kinase C. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **39**, 181–191.

TOXNET [Internet document] . (2019). URL https://toxnet.nlm.nih.gov/. Accessed 05/05/2019.

Tsuchiya, H. (2015). Membrane Interactions of Phytochemicals as Their Molecular Mechanism Applicable to the Discovery of Drug Leads from Plants. *Molecules*, **20**, 18923–18966.

Tsuchiya, H. & Iinuma, M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from Sophora exigua. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, **7**, 161–165.

USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.1 (December 2013) : USDA ARS [Internet document] . (2019). URL https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/nutrient-data-laboratory/docs/usda-database-for-the-flavonoid-content-of-selected-foods-release-31-december-2013/. Accessed 04/05/2019.

Vaiyapuri, S., Ali, M.S., Moraes, L.A., Sage, T., Lewis, K.R., Jones, C.I. & Gibbins, J.M. (2013). Tangeretin regulates platelet function through inhibition of phosphoinositide 3-kinase and cyclic nucleotide signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **33**, 2740–2749.

Varga-Szabo, D., Braun, A. & Nieswandt, B. (2009). Calcium signaling in platelets. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, **7**, 1057–1066.

Vickery, H.B., Nelson, E.M., Almquist, H.J. & Elvehjem, C.A. (1950). Term “Vitamin P” Recommended to be Discontinued. *Science*, **112**, 628–628.

Vlasic, N., Medow, M.S., Schwarz, S.M., Pritchard, K.A. & Stemerman, M.B. (1993). Lipid fluidity modulates platelet aggregation and agglutination in vitro. *Life Sciences*, **53**, 1053–1060.

Wang, L., Lee, I.-M., Zhang, S.M., Blumberg, J.B., Buring, J.E. & Sesso, H.D. (2009). Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women123. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **89**, 905–912.

Wang, S., Meckling, K.A., Marcone, M.F., Kakuda, Y. & Tsao, R. (2011). Synergistic, Additive, and Antagonistic Effects of Food Mixtures on Total Antioxidant Capacities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 960–968.

Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I. & Shen, C.-L. (2014a). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, **25**, 1–18.

Wang, X., Ouyang, Y.Y., Liu, J. & Zhao, G. (2014b). Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *British Journal of Nutrition*, **111**, 1–11.

Wilson, S.J., Newby, D.E., Dawson, D., Irving, J. & Berry, C. (2017). Duration of dual antiplatelet therapy in acute coronary syndrome. *Heart*, **103**, 573–580.

Wright, B., Moraes, L.A., Kemp, C.F., Mullen, W., Crozier, A., Lovegrove, J.A. & Gibbins, J.M. (2010). A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. *British Journal of Pharmacology*, **159**, 1312–1325.

Wright, B., Spencer, J.P.E., Lovegrove, J.A. & Gibbins, J.M. (2013). Flavonoid inhibitory pharmacodynamics on platelet function in physiological environments. *Food & Function*, **4**, 1803–1810.

Wu, T., He, M., Zang, X., Zhou, Y., Qiu, T., Pan, S. & Xu, X. (2013). A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of E. coli by membrane interaction effect. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1828**, 2751–2756.

Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U. & Li, H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, **174**, 1633–1646.

Xu, J., Xu, Z. & Zheng, W. (2017). A Review of the Antiviral Role of Green Tea Catechins. *Molecules*, **22**, 1337.

Yang, Y.-M., Chen, J.-Z., Wang, X.-X., Wang, S.-J., Hu, H. & Wang, H.-Q. (2008). Resveratrol attenuates thromboxane A2 receptor agonist-induced platelet activation by reducing phospholipase C activity. *European Journal of Pharmacology*, **583**, 148–155.

Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R. & Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, **59**, 113–122.

Yoshida, K., Nagatoishi, S., Kuroda, D., Suzuki, N., Murata, T. & Tsumoto, K. (2019). Phospholipid Membrane Fluidity Alters Ligand Binding Activity of a G Protein-Coupled Receptor by Shifting the Conformational Equilibrium. *Biochemistry*, **58**, 504–508.

Yu, H.Y., Park, S.W., Chung, I.M. & Jung, Y.-S. (2011). Anti-platelet effects of yuzu extract and its component. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, **49**, 3018–3024.

Zakaryan, H., Arabyan, E., Oo, A. & Zandi, K. (2017). Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. *Archives of Virology*, **162**, 2539–2551.

Zamora-Ros, R., Knaze, V., Luján-Barroso, L., Slimani, N., Romieu, I., Fedirko, V., Magistris, M.S. de, Ericson, U., Amiano, P., Trichopoulou, A., Dilis, V., Naska, A., Engeset, D., Skeie, G., Cassidy, A., Overvad, K., Peeters, P.H.M., Huerta, J.M., Sánchez, M.-J.,

Quirós, J.R., Sacerdote, C., Grioni, S., Tumino, R., Johansson, G., Johansson, I., Drake, I., Crowe, F.L., Barricarte, A., Kaaks, R., Teucher, B., Bueno-de-Mesquita, H.B., Rossum, C.T.M. van, Norat, T., Romaguera, D., Vergnaud, A.-C., Tjønneland, A., Halkjær, J., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, M.-C., Touillaud, M., Salvini, S., Khaw, K.-T., Wareham, N., Boeing, H., Förster, J., Riboli, E. & González, C.A. (2011). Estimated dietary intakes of flavonols, flavanones and flavones in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) 24 hour dietary recall cohort. *The British Journal of Nutrition*, **106**, 1915–1925.

Zhu, Y., Fu, J., Shurlknight, K.L., Soroka, D.N., Hu, Y., Chen, X. & Sang, S. (2015). Novel Resveratrol-Based Aspirin Prodrugs: Synthesis, Metabolism, and Anticancer Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **58**, 6494–6506.

Zubair, M.H., Zubair, M.H., Zubair, M.N., Zubair, M.M., Aftab, T. & Asad, F. (2011). Augmentation of anti-platelet effects of aspirin. *The Journal of the Pakistan Medical Association*, **61**, 304–307.

9 PRILOZI

Ovaj dodatak sadrži tri znanstvena rada ood kojih je jedan objavljen a dva su prihvaćena za objavu u časopisima zastupljenim u bazama WOS, SCOPUS, PUBMED a obrađuju teme vezane za sadržaj ovog doktorskog rada:

9.1 Prilog 1

Babić, I., Bojić, M., Maleš, Ž., Zadro, R., Gojčeta, K., Duka, I., Rimac, H. & Jukić, I. (2019). Influence of flavonoids' lipophilicity on platelet aggregation. Acta Pharm., 69, 607–619.

Acta Pharm. **69** (2019) 607–619 Original research paper
https://doi.org/10.2478/acph-2019-0040

Influence of flavonoids' lipophilicity on platelet aggregation

IVANA BABIĆ[1]
MIRZA BOJIĆ[2,*]
ŽELJAN MALEŠ[3]
RENATA ZADRO[4,5]
KORALJKA GOJČETA[1]
IVAN DUKA[3]
HRVOJE RIMAC[2]
IRENA JUKIĆ[1]

[1] *Croatian Institute of Transfusion Medicine, HR-10000 Zagreb, Croatia*

[2] *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry Department of Medicinal Chemistry HR-10000 Zagreb, Croatia*

[3] *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry Department of Pharmaceutical Botany HR-10000 Zagreb, Croatia*

[4] *University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry Department of Clinical Chemistry and Haematology, HR-10000 Zagreb Croatia*

[5] *University Hospital Centre Zagreb Department of Laboratory Diagnostics HR-10000 Zagreb, Croatia*

Accepted July 23, 2019
Published online September 5, 2019

Flavonoids are natural polyphenolic compounds present in a wide spectrum of plants that have a beneficial effect on human health. In the context of cardiovascular diseases related to plaque and thrombus formation, flavonoids exhibit an antiaggregatory effect. Previously, it has been reported that all tested flavonoids exhibit an antiaggregatory effect on platelet aggregation when measured by impedance aggregometry on whole blood, in the test of aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP). As not all flavonoids have the same targets within signaling pathways, an assumption of a common non-specific mechanism related to lipophilicity is to be considered. To test this hypothesis, reverse-phase thin layer chromatography was used to assess the lipophilicity of flavonoids; impedance aggregometry was used for testing of platelet aggregation and flow cytometry to monitor the influence of flavonoids on platelet activation. Lipophilicity analysis showed a highly negative correlation of log*P* and *MINaAC* for groups of flavones and flavanones. As determined by flow cytometry, the exposition of receptors necessary for the promotion of platelet activation and primary clot formation was diminished, *i.e.*, lowered expression of the activated form of integrin αIIbβ3 was observed in the presence of flavanone. Platelet membrane stabilization by flavonoids as a mechanism of antiaggregatory effect has been supported by impedance aggregometry experiments when specific inhibitors of platelet aggregation signaling pathways (U73122, indomethacin, verapamil) were used in the presence of a weak (ADP) and a strong (TRAP-6) agonist of aggregation. While individual flavonoids can have specific targets within aggregation signaling pathways, all flavonoids share a common non-specific mechanism of platelet aggregation inhibition related to their lipophilicity and membrane stabilization that, to some extent, contributes to their antiaggregatory effect.

Keywords: flavonoids, platelets, lipophilicity, flow cytometry, antiaggregatory activity

Flavonoids are natural polyphenolic compounds present in a wide spectrum of plants. One of the prominent and well documented beneficial effects on human health that has been confirmed in epidemiological studies is known as French paradox, *i.e.*, although

* Correspondence; e-mail: mbojic@pharma.hr

French population consumes fat-rich diet, incidence of cardiovascular diseases is lower than expected as their diet is also rich in polyphenols (1, 2). Based on their accessibility to humans through the dietary intake of fruits, vegetables and some beverages, flavonoids have been a topic of research for many years including their possible use as lead compounds for novel pharmaceutical agents. Many *in vitro* studies on plant and fruit extracts or on pure flavonoid compounds confirm antithrombotic, especially antiplatelet, effect in dose depending manner although without revealing the mechanism of action (3–5). In regard to cardiovascular diseases related to plaque and thrombus formation, flavonoids exhibit the antiaggregatory effect. For some flavonoids, this is attributed to the inhibition of cyclooxygenase, lipoxygenase, tyrosine-kinase, phosphodiesterase or phospholipase which participate in platelet signaling pathway (6–8).

Lipophilicity of flavonoids has been a subject of studies exploring flavonoid-membrane interactions. According to the results presented in previous studies, flavonoids are positioned within the membrane depending on their polarity, with more hydrophobic ones which penetrate deeper in the core of membrane bilayer, interact with membrane transporter proteins, and decrease membrane fluidity (9, 10). Platelet membrane is the best example of membrane fluidity; it functions as a dynamic structure involved in processes of activation and aggregation. These processes depend strongly on phospholipid transverse distribution in resting and activated state, and processes in the inner leaflet of platelet membrane (11).

Work of Lipinski *et al.* (12) represents the milestone for determination of the relationship between pharmacokinetic and physicochemical parameters by establishing "rule-of-five" and uses log*P* as a measure of the compound's lipophilicity. Partition coefficient (*P*) represents a ratio between the concentration of the non-ionized form of the compound in the *n*-octanol-water system expressed in logarithmic scale (log*P*). While the shake-flask method is the gold standard for log*P* determination, lipophilicity is nowadays more often determined indirectly by liquid chromatography (13). The simple approach is the determination by planar chromatography that uses chromatographic parameter R_M (parameter calculated based on the retention factor of substance) as a surrogate measurement of lipophilicity. To bypass laborious and time-consuming experimental methods, several computational approaches for the prediction of lipophilicity (log*P*) have been developed based on pool of predefined atoms, fragments and their contribution factors (14–16).

In the previous work by Bojić *et al.* (17) it has been shown that all tested flavonoids, without exception, exhibit the antiaggregatory effect on platelet aggregation induced by adenosine diphosphate (ADP). As not all flavonoids have the same targets within signaling pathways, an assumption of a common non-specific mechanism related to lipophilicity is to be considered. Thus, the aim of this study was to examine the flavonoids antiaggregatory mechanism based on lipophilicity and influence of flavonoids on platelet membrane rigidity/fluidity.

EXPERIMENTAL

Subjects

Blood samples were collected at Croatian Institute of Transfusion Medicine (Zagreb, Croatia) in 4.5-mL vacutainer tubes with tri-sodium citrate (3.8 %) as an anticoagulant. Fifty blood donors who were not on any antiaggregatory therapy gave written, informed consents before participating in research. The study was conducted according to Helsinki declaration and with approval of Ethics Committee of the Croatian Institute of Transfusion

Medicine and the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry. All measurements were conducted in two hours after the blood sample collection.

Reagents

Flavonoid aglycons used in this work are listed in Table I. Flavonoid solutions were prepared by dissolving standards in methanol (Kemig, Croatia) for the purpose of thin-layer chromatography analysis, while serial of doubling dilutions ($1/2^n$) in dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck KgaA, Germany) in the concentration range of 500 mmol L^{-1} to 62 nmol L^{-1} was used for platelet aggregation analysis. ADP, collagen, TRAP-6, arachidonic acid (AA) and ristocetin were obtained from Roche Diagnostics (Germany), and saline (0.9 % NaCl) with and without calcium chloride from the Croatian Institute of Transfusion Medicine. Inhibitor of cyclooxygenase, indomethacin, and calcium channels blocker, verapamil hydrochloride, were purchased from Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Belgium) and inhibitor of phospholipase C (PLC), U73122 from Merck KgaA. Anti-integrin αIIbβ3 antibody (PAC-1) labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD61 labelled with phycoerythrin (PE), FITC mouse IgM, κ isotype control and PE mouse IgG1, κ isotype control for flow cytometry experiments were purchased from Becton Dickinson (USA). Reverse-phase thin-layer chromatography was performed on Merck RP-18 F254S plates with a mobile phase consisting of water, acetonitrile and glacial acetic acid (last two solvents were obtained from Kemig, Croatia, while distilled water was prepared in house).

Reverse-phase thin-layer chromatography and computational determination of lipophilicity

Twenty flavonoid compounds were analyzed by reverse-phase thin-layer chromatography (RP-TLC) using acetonitrile/water/glacial acetic acid in a ratio 66:33:1 (*V*/*V*/*V*) as a mobile phase. After development, flavonoids were detected as dark spots on a chromatographic plate with the fluorescent indicator (wavelength 254 nm). Based on retention factor, R_F, chromatographic parameter R_M was calculated as follows $R_M = \log [(1/R_F) - 1]$.

Calculation of theoretical log*P* was performed using online applications Chemicalize (https://chemicalize.com), ChemSketch (http://www.chemspider.com), Molinspiration (https://www.molinspiration.com) and SwissADME (http://www.swissadme.ch). SwissADME is calculating log*P* in five different ways and expresses their consensus log*P* value. Values of experimentally determined chromatographic parameter R_M were correlated with calculated log*P* values using MS Office Excel (Microsoft, USA) and reported as correlation coefficient and adjusted squared correlation coefficient at a significance level of $p < 0.05$.

Impedance aggregometry

Impedance aggregometry on whole blood was monitored on Multiplate® instrument (Roche Diagnostics, Germany) and was used for determination of minimum antiaggregatory concentration (*MINaAC*) of flavanone in the presence of a set of agonists (TRAP-6, ADP, collagen, AA, ristocetin) by previously described method (17). Briefly, the influence of serial doubling concentrations of flavanone on platelet aggregation was measured by using original Multiplate procedure as follows: 300 µL of blood was incubated for 3 minutes at 37 °C with 20 µL flavonoid and 300 µL of saline-$CaCl_2$ preheated at 37 °C. Vehicle – DMSO (final concentration 3 %) was used as a negative control (untreated sample). Aggregation was induced by addition of 20 µL of the agonist with final concentrations: 6.3 µmol L^{-1} ADP, 3.1 µg mL^{-1} collagen, 31 µmol L^{-1} TRAP-6, 0.48 µmol L^{-1} AA, and 0.3 mg mL^{-1} ristocetin. *MINaAC* was

determined in three independent measurements for treated and untreated sample using the Student's *t*-test. The same pre-defined Multiplate protocol was followed for the assessment of the combined effect of inhibitory drugs (U73122 hydrate, verapamil hydrochloride, indomethacin) and flavanone. Measurements were conducted with TRAP-6 as a strong and ADP as a weak agonist using 15 and 60 x *MINaAC* of flavanone to ensure repeatable inhibition effect on platelet aggregation. U73122 hydrate, verapamil hydrochloride, and indomethacin were used in concentrations previously reported in the literature (18–20), *i.e.*, 4 μmol L^{-1} U73122, 82.5 μmol L^{-1} verapamil and 0.21 μmol L^{-1} indomethacin in platelet aggregation test induced with 30 μmol L^{-1} TRAP-6, while in platelet aggregation test induced with 6.3 μmol L^{-1} ADP concentrations were for U73122, verapamil and indomethacin 3.2 μmol L^{-1}, 52 μmol L^{-1} and 0.21 μmol L^{-1}, resp. Results of aggregation for untreated sample (DMSO, 0.8 %), flavanone treated, inhibitor drug-treated, and for the sample treated with the combination of flavanone and inhibitor drug were statistically assessed using ANOVA.

Flow cytometry

Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of freshly drawn citrate blood samples at 150 *g* for 10 min. Platelet concentration was adjusted to 20.000 per μL with phosphate-buffered saline (pH 7.4). One mL of PRP was pre-incubated with three dilutions of flavanone (30, 244 and 488 μmol L^{-1}) or with the vehicle as a control (DMSO, 0.8 %) for 15 minutes at 37 °C. An aliquot of 72 μL treated sample (flavanone, DMSO) was mixed with agonist TRAP-6 (final concentration 21 μmol L^{-1}) and the excess amount of anti-CD61 (PE) to mark platelet population and PAC-1 FITC to monitor the activated form of integrin αIIbβ3. The sample was incubated in the dark at 37 °C, for 30 min. Flow cytometry runs were performed on FC500, Beckman Coulter (France). To distinguish platelet cell population based on cell size and granularity, forward *vs.* side scatter was used collecting 10.000 CD61 positive events. Isotype controls FITC labelled mouse IgM κ, and IgG1 PE were used to monitor the level of non-specific background signal. Activated platelets were assessed as the percentage of platelets with positive activation-dependent platelet surface marker PAC-1 FITC in CD61 positive cells gate. Results were obtained as a measurement in triplicate and tested with paired Student's *t*-test for significance. To confirm the concentration level of flavanone which caused statistically significant inhibition of platelet activation, measurements were repeated on five independent samples in triplicate.

Statistical analysis

The antiaggregatory effect of flavanone and inhibitor drugs were assessed with one-way ANOVA test with *post hoc* Tukey analysis for multiple comparison. For comparison of R_M and log*P* linear regression analysis was performed. Paired Student's *t*-test was used for the estimation of *MINaAC* and platelet activation inhibition measured by flow cytometry. If not otherwise stated, statistical analysis was performed within R v2.8.1 environment (R-project, Austria).

RESULTS AND DISCUSSION

Lipophilicity of flavonoids

To assess the lipophilicity of flavonoids reverse-phase thin-layer chromatography was conducted on a series of 20 compounds. Chromatographic parameter, R_M, the surrogate of

Table I. Experimental (chromatographic parameter R_M), calculated parameters (logP) of flavonoid lipophilicity and MINaC[a]

Flavonoid	R_M	*MINaAC* (μmol L^{-1})	log*P*_ ChemAxon	log*P*_ ChemSketch	log*P*_ Molinspiration	Swiss_ ilog*P*	Swiss_ xlog*P*3	Swiss_ wlog*P*	Swiss_ mlog*P*	Swiss_ silicos-it	Swiss_ consensuslog*P*
Flavones											
Flavone[b]	0.3892	3.815	2.97	3.56	3.74	2.55	3.56	3.46	2.27	4.04	3.18
6-Hydroxyflavone[c]	–0.0378	0.954	2.66	3.72	3.23	2.28	3.62	3.17	1.66	3.52	2.85
7-Hydroxyflavone[c]	–0.0884	15.259	2.66	3.32	3.23	2.22	3.62	3.17	1.66	3.52	2.84
Tangeretin[d]	0.4202	30.518	2.18	2.66	3.78	3.71	3.04	3.5	0.63	4.21	3.02
Tectchrysine[e]	0.5202	0.954	3.16	3.13	3.48	2.88	3.85	3.17	1.33	3.52	2.95
Chrysine dimethyl ether[e]	0.5202	1.907	3.01	3.27	3.75	2.95	3.62	3.48	1.57	4.04	3.13
Chrysine[b]	0.0126	3.815	3.01	2.88	2.94	2.27	3.52	2.87	1.08	3.02	2.55
Acacetin[d]	0.0378	3.815	2.85	3.15	3.00	2.56	3.35	2.88	0.77	3.03	2.52
Diosmetin[e]	–0.3590	7.629	2.55	3.10	2.28	2.47	3.1	2.59	0.22	2.55	2.19
Apigenin[b]	–0.3892	3.815	2.71	2.10	2.46	1.89	3.02	2.58	0.52	2.52	2.11
Luteolin[e]	–0.5942	7.629	2.40	2.40	1.97	1.86	2.53	2.28	-0.03	2.03	1.73
Flavonols											
3,6-Dihydroxyflavone[c]	–0.0378	0.119	2.42	3.64	2.94	1.97	3.05	2.87	1.08	3.02	2.4
3,7-Dihydroxyflavone[c]	–0.0631	1.907	2.42	3.27	2.94	2.01	3.05	2.87	1.08	3.02	2.4
Galangin[b]	0.0000	122.070	2.76	2.83	2.65	2.08	2.25	2.58	0.52	2.52	1.99
Rhamnetin[d]	–0.2083	0.954	2.30	2.58	2.22	2.23	1.87	2.29	–0.31	2.06	1.63
Isorhamnetin[d]	–0.3203	7.629	2.30	1.76	1.99	2.35	1.87	2.29	–0.31	2.06	1.65
Quercetin[b,f]	–0.5863	15.259	2.77	2.07	1.68	1.63	1.54	1.99	–0.56	1.54	1.23
Flavanons											
Pinocembrin-7-methylether[e]	0.3100	0.954	3.28	4.11	3.13	2.75	3.20	2.78	1.52	3.06	2.66
Pinocembrin[e]	–0.1076	15.259	3.14	3.93	2.60	2.11	2.88	2.48	1.27	2.55	2.26
Hesperetin[b]	–0.4536	1.907	2.68	2.90	1.94	2.24	2.60	2.19	0.41	2.08	1.91
Flavanone[b]	0.1811	0.062	3.10	3.62	3.18	2.41	3.14	3.07	2.47	3.57	2.93

[a] MINaAC represents minimal antiaggregatory concentration (taken from reference 17).

Flavonoids purchased from: [b] Merck KgaA, Germany, [c] ChromaDex, USA, [d] BioChemika, Switzerland, [e] Extrasynthese, France.

[f] In the form of quercetin dihydrate.

log*P*, was in the range from –0.59 to 0.52. The highest R_M values were obtained for tectochrysin and chrysin dimethyl ether, and the lowest for luteolin (Table I).

Table II. Results of regression analysis for chromatographic parameter R_M *and log*P *for flavonoids from Table I*

Application	Adjusted R^2	Multiple R	p-value
log*P*_ChemAxon	0.1556	0.4448	0.0434
log*P*_ChemSketch	0.2605	0.5454	0.009
log*P*_Molinspiration	0.8545	0.9283	<0.001
Swiss_ilog*P*	0.5649	0.7659	<0.001
Swiss_xlog*P*3	0.4011	0.6566	0.0012
Swiss_wlog*P*	0.7269	0.8605	<0.001
Swiss_mlog*P*	0.4678	0.7032	<0.001
Swiss_silicos-it	0.7530	0.8748	<0.001
Swiss_consensuslog*P*	0.7315	0.8631	<0.001

Computational values of log*P* determined in Chem Axon were in the range of 2.18 to 3.28 with the highest value for pinocembrin-7-methylether. The same compound had the highest value of ChemSketch calculated log*P* (4.11). In the case of Molinspiration calculated log*P*, the most lipophilic flavonoids were flavone (3.74), tangeretin (3.78) and techtochrysin (3.48). SwissADME calculates log*P* according to five different algorithms and expresses their consensus log*P* value. These values were the highest for flavone (3.18), tangeretin (3.02) and chrysin dimethyl ether (3.13) which is in accordance with experimentally determined R_M values.

Results of linear regression (Table II) for multiple log*P* and R_M showed strong positive correlation $R = 0.8631$ and $R = 0.9283$ ($p < 0.001$) for calculated SwissADME consensus log*P* and Molinspiration program, resp. ChemSketch and Chemicalize log*P* showed moderate positive correlation to chromatographic parameter R_M $R = 0.5454$ ($p = 0.009$) and $R = 0.4448$ ($p = 0.0434$).

Based on the strong positive correlation between R_M parameter and log*P* calculated by Molinspiration and SwissADME application and moderate positive correlation with ChemSketch and Chemicalize log*P*, it can be concluded that chromatographic parameter R_M is a good surrogate of log*P* and a good predictor of flavonoid lipophilicity.

This approach was also previously used as a part of QSAR study of flavonoids as bacteriostatic agents against *Escherichia coli*, with the conclusion that high correlation between calculated log*P* (Clog*P*) values and predicted MIC_{50} implies that hydrophobicity plays a major role in the antibacterial activity of flavonoids by their interaction with membranes (21). When inhibition of Syk protein tyrosine kinase activity and human mast cells degranulation was studied on a set of flavonoids, a significant relationship was observed between compound log*P* and the observed inhibitory effect (22). Log*P* was also included in global models for the evaluation of toxicity of flavonoid compounds in the metabolic environment of mammals (23). As a measure of lipophilicity, log*P* offers a very convenient way of predicting the possible extent of flavonoid action *in vivo* based on their interaction with biomembranes.

Relationship between inhibition of platelet aggregation and lipophilicity of flavonoids

For flavonoids listed in Table I previously tested in platelet aggregation assay induced by ADP (17), *MINaAC* values were correlated with calculated log*P* (Table III).

*Table III. Correlations for log*P *and minimal antiaggregatory concentration (MINaAC) of flavonoids*

Application	Flavone	Flavonols	Flavanons	Flavons and flavonols	Flavons and flavonons	Flavonols and flavonons
log*P*_ChemAxon	–0.7576[a]	0.6691	0.1599	–0.0103	–0.5922[a]	0.0724
log*P*_ChemSketch	–0.2667	0.0082	0.3013	–0.1214	–0.2005	–0.1545
log*P*_Molinspiration	0.1908	0.1341	–0.2218	–0.0597	0.1498	–0.0047
Swiss_i*logP*	0.5384	0.0062	–0.6678	–0.0279	0.4078	–0.1949
Swiss_x*logP*3	–0.3550	–0.1014	–0.2666	–0.3042	–0.2297	–0.2414
Swiss_w*logP*	0.2406	0.0428	–0.3616	–0.1106	0.1785	–0.0545
Swiss_m*logP*	–0.2522	0.0983	–0.2195	–0.1419	–0.2668	–0.1333
Swiss_silicos-it	0.2836	0.0303	–0.3728	–0.1070	0.1996	–0.1066
Swiss_consensus*logP*	0.1157	0.0185	–0.3645	–0.1628	0.0542	–0.1611

[a] Statistically significant correlation ($p < 0.05$).

The relationship was tested on a whole set of flavonoids, as well as individual classes of flavonoids and their combinations (flavones, flavonols, flavanones, flavones and flavonols, flavones and flavanones, flavonols and flavanones). Statistically significant correlation was found between *MINaAC* and log*P* calculated by Chemicalize application: strong negative correlation $R = –0.7576$ ($p = 0.0069$) for flavone group and moderate negative correlation $R = –0.5922$ ($p = 0.0200$), for combined groups of flavone and flavanone. Van Dijk *et al.* (24) found that flavonols exhibited a substantially higher affinity for liposomes than flavanones attributing this result with a far more planar configuration of the flavonols in comparison with the tilted configuration of flavanones. Oteiza *et al.* (10) proposed lipophilicity of flavonoid molecule as a basis for flavonoid interactions with biomembranes as well as interactions of polyphenols at the surface of bilayers through hydrogen bonding that can act to reduce the access of deleterious molecules, thus protecting the structure and function of membranes. Results of the study by Arora *et al.* (25) on the modulation of membrane fluidity by flavonoids suggest that partition into the hydrophobic core causes a dramatic decrease in lipid fluidity of the membrane.

Our results are in concordance with the assumption that flavonoids have a tendency to localize in the membrane bilayer based on their lipophilicity. In that sense, flavonoids with higher lipophilicity have greater potency to interact with the membrane and consequently cause inhibition of platelet aggregation at a lower concentration, presumably by causing a decrease in lipid fluidity. Thus, the stabilized platelet membrane is less susceptible to the inducers of platelet aggregation. This is in accordance with high negative correlation observed between values of log*P* calculated by Chemicalize application with *MINaAC* values; flavonoids with higher values of log*P* have lower values of *MINaAC* and stronger antiplatelet effect.

When average values of log*P* (Chemaxon) for different classes of flavonoids were calculated (based on data in Table I), the following trend was observed: flavanones (2.50), flavonols (2.76), flavones (3.05). The same trend was observed when comparing antiaggregatory effect; the higher lipophilicity is, the more prone antiaggregatory effect is, *i.e.*, *MINaAC* are lower: flavanons (24.66 μmol L^{-1}), flavonols (7.75 μmol L^{-1}), flavones (4.55 μmol L^{-1}).

Although this observation confirms objective of our work, it should be noted that not all classes of flavonoids were equally represented in our study (flavanones, $n = 4$, flavonols, $n = 6$, flavones, $n = 11$).

Influence of flavonoids and antiplatelet drugs combinations on primary hemostasis

When compared to our previous study, an antiaggregatory activity which was evaluated on a set of 30 flavonoids in the platelet-aggregation assay induced by ADP (17), flavanone showed much higher potency with *MINaAC* concentration in the nanomolar range (63 nmol L^{-1}). As this was the lowest *MINaAC* that we have observed among all flavonoids present in our library of compounds, further studies were conducted using different commercially available inducers of platelet aggregation for impedance aggregometry, namely TRAP-6, collagen, ristocetin and arachidonic acid (Table IV).

Table IV. Effects of flavanone on platelet aggregation depending on the agonist used in impedance aggregation assay

Agonist	*MINaAC* (μmol L^{-1})	*p*-value
ADP	0.063	0.0366
TRAP-6	2.000	0.0310
Collagen	0.500	0.0175
Ristocetin	0.500	0.0270
AA	0.500	0.0037

AA – arachidonic acid, ADP – adenosine diphosphate, *MINaAC* – minimal antiaggregatory concentration, TRAP-6 – thrombin receptor-activating peptide (hexapeptide)

In the herein presented study, *MINaAC* of 0.063 μmol L^{-1} was observed when a weak agonist ADP was used to induce aggregation. When TRAP-6, hexapeptide surrogate of thrombin, was used as an inducer of platelet aggregation *MINaAC* of 2 μmol L^{-1} was obtained. Similarly, stronger inducers of platelet aggregation required more flavanone to observe a statistically significant decrease of platelet, *i.e.*, *MINaAC* was 0.5 μmol L^{-1} in platelet aggregation assays induced by collagen, ristocetin and AA.

Experiments on the combined inhibitory effect of flavanone and known inhibitors of platelet aggregation were designed on Multiplate® analyzer to assess their interactions and, to some extent, indicate a possible mechanism of flavanone action in the presence of strong or weak agonist. A PLC inhibitor U73122, calcium channels blocker verapamil and cyclooxygenase inhibitor indomethacin were used for this purpose. Each experiment included the determination of platelet aggregation of either flavanone or the inhibitor (known antiplatelet drug), or the combination of flavonoid and inhibitor. Platelet aggregation assays in this instance were induced by a strong (TRAP-6) or a weak (ADP) agonist of aggregation. To assess the statistical significance of different treatments one-way ANOVA with *post hoc* test was used for results assessment. The results of these analyses are shown in Fig. 1.

The statistically significant difference between treated samples was observed for the combination of U73122, an inhibitor of PLC, and flavanone, for both (TRAP-6, ADP) agonist applied (Fig. 1a). As expected, flavanone standard reduced platelet aggregation by 14 %,

U73122 reduced platelet aggregation by 25 % while the combination of the two reduced platelet aggregation by 35 % in TRAP-6 induced platelet assay. However, the combined effect of flavanone and U73122 on platelet aggregation induced by ADP was a reduction of 50 %. Significant combined inhibitory effect of flavanone and U73122 on the first and most important enzyme in platelet activation cascade, even in the presence of a strong agonist, could be the consequence of specific inhibition of PLC-mediated signaling pathways upstream of PLC. As membrane fluidity is involved in the regulation of platelet activation, *i.e.*, change of cell shape, pseudopodia formation and exposition of receptors that stimulate platelet aggregation (26, 27), our assumption is that flavonoids as lipophilic substances influence membrane fluidity by increasing membrane rigidity thus reducing the exposition of receptors at the membrane surface and subsequent activation of platelet aggregation signaling pathways. Experiments on G protein-coupled receptor show that increased membrane fluidity stimulates an active form of the receptor (28). Flavanone can interact in a non-specific way with platelet membrane, and, thus, interfere in signal transduction of G-coupled proteins to PLC.

When combined with verapamil, flavanone showed a reduction of platelet aggregation induced by TRAP-6 (Fig. 1b). However, this effect was not observed when ADP was used as platelet aggregation inducer. As both pathways induced by ADP and TRAP-6 include calcium liberation from dense tubules it could be assumed that this is not a common target (29). Rather, upstream signaling pathways unique to TRAP-6 such as Rho/Rho-kinase could be possible targets of flavanone (29). The absence of combined inhibitory influence of flavanone and indomethacin regardless of the used agonist (Fig. 1c), indicates that the antiaggregatory effect of flavanone is not achieved downstream of cyclooxygenase 1.

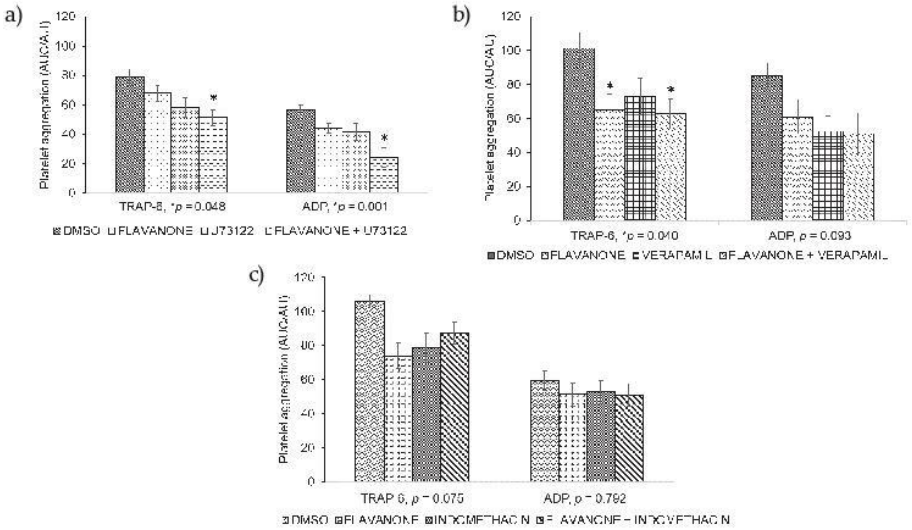


Fig. 1. Results of impedance aggregometry assays induced by a strong (TRAP-6) and a weak (ADP) agonist of aggregation for: a) flavanone and a phospholipase C inhibitor U73122, b) calcium channels blocker verapamil and c) cyclooxygenase inhibitor indomethacin, and flavanone and inhibitor drug combinations. Asterisks indicate statistical significance.

Although the methodology used in these experiments lacks sensitivity to pinpoint precise target of flavanone, results obtained are in accordance with the presumption of the non-specific mechanism of platelet aggregation through the interaction with the membrane rigidity.

Flow cytometry

If flavanone influences membrane rigidity, expression of receptors on platelet surface will be reduced, *e.g.*, by inhibiting transverse diffusion also known as flip-flop. To assess the expression of receptors in the presence and the absence of flavonoid, flow cytometry was used. Platelet activation trough modulation of inside-out signaling of integrin αIIbβ3 is significantly inhibited by flavanone (Figs. 2 and 3).

The observed effect is dose-dependent ($R = 0.9897$, $p < 0.05$, Fig. 2). An example of flow cytometry results is shown in Fig. 3: statistically significant reduction in the receptor exposition is achieved at higher concentrations of flavanone (488 μmol L^{-1}) when compared to the untreated samples of the same participant ($p = 0.0031$). This result was confirmed subsequently by the analysis of five independent blood samples ($p = 0.0018$).

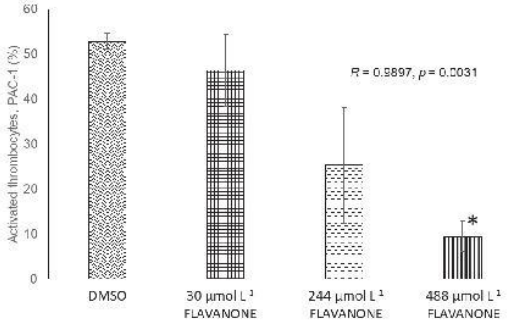


Fig. 2. Inhibitory effect of flavanone on platelet aggregation induced by TRAP-6 on platelet-rich plasma.

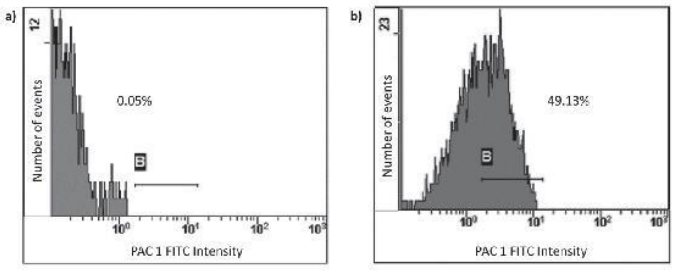


Fig. 3. Flow cytometry analysis of platelet activation induced by TRAP-6 in: a) absence and b) the presence of flavanone. Mean fluorescence intensity is measured using integrin αIIbβ3 antibody.

Despite the noticeable effect, when compared with *MINaAC* observed in impedance aggregometry, only a rather high concentration of flavanone achieved significant inhibition of platelet activation in flow cytometry experiments. This could be due to the difference in the type of samples (impedance aggregometry uses whole blood while platelet-rich plasma is used for flow cytometry experiments), as well as experimental set up (concentration, sample manipulation, time, *etc*.). This is in accordance with the results of Ostertag *et al.* (30) and Vaiyapuri *et al.* (31) who also used higher concentrations of phenolic compounds to see measurable results in flow cytometry experiments. Although they present complementary methods, flow cytometry and impedance aggregometry comprise different aspects of platelet function and are therefore not interchangeable when agonist-induced platelet reactivity is assessed (32). As for methodology, impedance aggregometry, by performing in whole blood, enables other blood elements to influence platelet aggregation, therewith, functions under more physiological conditions (33).

CONCLUSIONS

In platelet aggregation assays induced by ADP, all flavonoids showed antiaggregatory activity (17), suggesting a non-specific mechanism of action related to their lipophilicity and stabilization of platelet membrane. Lipophilicity analysis showed a highly negative correlation between log*P* and *MINaAC* for groups of flavones and flavanones confirming the objective of our study. If so, the exposition of receptors necessary for the promotion of platelet activation and primary clot formation should be diminished. This was confirmed by flow cytometry in which lowered expression of the activated form of integrin αIIbβ3 was observed in the presence of flavanone. Platelet membrane stabilization by flavonoids as a mechanism of antiaggregatory effect has been supported by impedance aggregometry experiments when specific inhibitors of platelet aggregation signaling pathways were used in the presence of a weak and strong agonist of aggregation. While individual flavonoid can have specific targets within aggregation signaling pathways, flavonoids share a common non-specific mechanism of platelet aggregation inhibition related to their lipophilicity and membrane stabilization that, to some extent, contributes to their antiaggregatory effect.

Acknowledgements. – The authors would like to thank A. Jurak Begonja and J. Bingulac-Popović, for their helpful advices.

Acronyms, abbreviations, symbols. – AA – arachidonic acid, ADP – adenosine diphosphate, CD – cluster of differentiation, Clog*P* – calculated log*P*, FITC – fluorescein isothiocyanate, Ig – immunoglobulin, log*P* – logarithm of partition coefficient, *MINaAC* – minimal antiaggregatory concentration, PAC-1 – anti-integrin αIIbβ3 antibody, PE – phycoerythrin, PLC – phospholipase C, PRP – platelet-rich plasma, R_M – chromatographic parameter, surrogate measurement of lipophilicity, TRAP-6 – thrombin receptor-activating peptide (hexapeptide).

REFERENCES

1. P. Knekt, R. Jarvinen, A. Reunanen and J. Maatela, Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study, *Brit. Med. J.* **312** (1996) 478–481; https://doi.org/10.1136/bmj.312.7029.478
2. M. L. McCullough, J. J. Peterson, R. Patel, P. F. Jacques, R. Shah and J. T. Dwyer, Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults, *Am. J. Clin. Nutr.* **95** (2012) 454–464; https://doi.org/10.3945/ajcn.111.016634

3. M. L. Liang, X. W. Da, A. D. He, G. Q. Yao, W. Xie, G. Liu, J. Z. Xiang and Z. Y. Ming, Pentamethylquercetin (PMQ) reduces thrombus formation by inhibiting platelet function, *Sci. Rep.* **5** (2015) 11142 (11 pages); https://doi.org/10.1038/srep11142
4. Y. Wang, J. Tang, H. Zhu, X. Jiang, J. Liu, W. Xu, H. Ma, Q. Feng, J. Wu, M. Zhao and S. Peng, Aqueous extract of *Rabdosia rubescens* leaves: forming nanoparticles, targeting P-selectin, and inhibiting thrombosis, *Int. J. Nanomed.* **10** (2015) 6905–6918; https://doi.org/10.2147/IJN.S91316
5. S. Vaiyapuri, H. Roweth, M. S. Ali, A. J. Unsworth, A. R. Stainer, G. D. Flora, M. Crescente, C. I. Jones, L. A. Moraes and J. M. Gibbins, Pharmacological actions of nobiletin in the modulation of platelet function, *Br. J. Pharmacol.* **172** (2015) 4133–4145; https://doi.org/10.1111/bph.13191
6. E. S. Park, Y. Lim, S. H. Lee, B. M. Kwon, H. S. Yoo, J. T. Hong and Y. P. Yun, Antiplatelet activity of obovatol, a biphenolic component of *Magnolia obovata*, in rat arterial thrombosis and rabbit platelet aggregation, *J. Atheroscler. Thromb.* **18** (2011) 659–669; https://doi.org/10.5551/jat.7427
7. Y. R. Jin, X. H. Han, Y. H. Zhang, J. J. Lee, Y. Lim, J. H. Chung and Y. P. Yun, Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity, *Atherosclerosis* **194** (2007) 144–152; https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2006.10.011
8. P. Pignatelli, F. M. Pulcinelli, A. Celestini, L. Lenti, A. Ghiselli, P. P. Gazzaniga and F. Violi, The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide, *Am. J. Clin. Nutr.* **72** (2000) 1150–1155; https://doi.org/10.1093/ajcn/72.5.1150
9. A. B. Hendrich, Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds, *Acta. Pharmacol. Sin.* **27** (2006) 27–40; https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2006.00238.x
10. P. I. Oteiza, A. G. Erlejman, S. V. Verstraeten, C. L. Keen and C. G. Fraga, Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin. Dev. Immunol.* **12** (2005) 19–25; https://doi.org/10.1080/10446670410001722168
11. T. Lhermusier, H. Chap and B. Payrastre, Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome, *J. Thromb. Haemost.* **9** (2011) 1883–1891; https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04478.x
12. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (2001) 3–26; https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0
13. G. L. Biagi, A. M. Barbaro, O. Gandolfi, M. C. Guerra and G. Cantelli-Forti, R_m values of steroids as an expression of their lipophilic character in structure-activity studies, *J. Med. Chem.* **18** (1975) 873–883; https://doi.org/10.1021/jm00243a003
14. E. Kłosińska-Szmurło, F. A. Pluciński, M. Grudzień, K. Betlejewska-Kielak, J. Biernacka and A. P. Mazurek, Experimental and theoretical studies on the molecular properties of ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin in determining bioavailability, *J. Biol. Phys.* **40** (2014) 335–345; https://doi.org/10.1007/s10867-014-9354-z
15. B. J. Bennion, N. A. Be, M. W. McNerney, V. Lao, E. M. Carlson, C. A. Valdez, M. A. Malfatti, H. A. Enright, T. H. Nguyen, F. C. Lightstone and T. S. Carpenter, Predicting a drug's membrane permeability: A computational model validated with *in vitro* permeability assay data, *J. Phys. Chem. B.* **121** (2017) 5228–5237; https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b02914
16. A. Daina, O. Michielin and V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* **7** (2017) 42717 (13 pages); https://doi.org/10.1038/srep42717
17. M. Bojić, Ž. Debeljak, M. Tomičić, M. Medić-Šarić and S. Tomić, Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series, *Nutrition J.* **10** (2011) 73 (8 pages); https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-73

18. A. Brocchieri, L. Pacchiarini, A. Saporiti and G. Grignani, In vitro effect of verapamil on platelet activation induced by ADP, collagen or thrombin, *Platelets* **6** (1995) 195–199; https://doi.org/10.3109/09537109509078454
19. S. A. Saeed, H. Rasheed, F. A. Fecto, M. I. Achakzai, R. Ali, J. D. Connor and A. U. Gilani, Signalling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets, *Acta Pharmacol. Sin.* **25** (2004) 887–889.
20. J. W. Heemskerk, R. W. Farndale and S. O. Sage, Effects of U73122 and U73343 on human platelet calcium signalling and protein tyrosine phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta* **1355** (1997) 81–88; https://doi.org/10.1016/S0167-4889(96)00113-9
21. T. Wu, M. He, X. Zang, X. Zhou, T. Qiu, S. Pan and X. Xu, A structure-activity relationship study of flavonoids as inhibitors of E. coli by membrane interaction effect, *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (2013) 2751–2756; https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.029
22. M. Shichijo, N. Yamamoto, H. Tsujishita, M. Kimata, H. Nagai and T. Kokubo, Inhibition of syk activity and degranulation of human mast cells by flavonoids, *Biol. Pharm. Bull.* **26** (2003) 1685–1690; https://doi.org/10.1248/bpb.26.1685
23. A. Oliveira Filho, H. M. Fernandes, T. J. C. Assis, D. R. Meireles, O. Edeltrudes, E. Lima and H. L. F. Pêssoa, Pharmacological and toxicological analysis of flavonoid 5,7,4′-trimethoxyflavone: An in silico approach, *IJPPR* **7** (2015) 431–434.
24. C. van Dijk, A. J. Driessen and K. Recourt, The uncoupling efficiency and affinity of flavonoids for vesicles, *Biochem. Pharmacol.* **60** (2000) 1593–1600; https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00488-3
25. A. Arora, T. M. Byrem, M. G. Nair and G. M. Strasburg, Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids, *Arch. Biochem. Biophys.* **373** (2000) 102–109; https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1525
26. S. Kitagawa, M. Orinaka and H. Hirata, 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* **1179** (1993) 277–282; https://doi.org/10.1016/0167-4889(93)90083-2
27. N. Vlasic, M. S. Medow, S. M. Schwarz, K. A. Pritchard and M. B. Stemerman, Lipid fluidity modulates platelet aggregation and agglutination in vitro, *Life Sci.* **53** (1993) 1053–1060; https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90258-5
28. K. Yoshida, S. Nagatoishi, D. Kuroda, N. Suzuki, T. Murata and K. Tsumoto, Phospholipid membrane fluidity alters ligand binding activity of a G protein-coupled receptor by shifting the conformational equilibrium, *Biochemistry* **58** (2019) 504–508; https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01194 (in press)
29. M. Bojić, Ž. Debeljak, M. Medić-Šarić and M. Tomičić, Interference of selected flavonoid aglycons in platelet aggregation assay, *Clin. Chem. Lab. Med.* **50** (2012) 1403–1408; https://doi.org/10.1515/cclm-2011-0960
30. L. M. Ostertag, N. O'Kennedy, G. W. Horgan, P. A. Kroon, G. G. Duthie and B. de Roos, In vitro anti-platelet effects of simple plant-derived phenolic compounds are only found at high, non-physiological concentrations, *Mol. Nutr. Food Res.* **55** (2011) 1624–1636; https://doi.org/10.1002/mnfr.201100135
31. S. Vaiyapuri, M. S. Ali, L. A. Moraes, T. Sage, K. R. Lewis, C. I. Jones and J. M. Gibbins, Tangeretin regulates platelet function through inhibition of phosphoinositide 3-kinase and cyclic nucleotide signalling, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33** (2013) 2740–2749; https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301988
32. T. Gremmel, R. Koppensteiner and S. Panzer, Comparison of aggregometry with flow cytometry for the assessment of agonists'-induced platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy, *PLoS One* **10** (2015) e0129666 (13 pages); https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129666
33. K. Koltai, G. Kesmarky, G. Feher, A. Tibold and K. Toth, Platelet aggregometry testing: Molecular mechanisms, techniques and clinical implications, *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017) 1803 (21 pages); https://doi.org/10.3390/ijms18081803

9.2 Prilog 2

Maleš, Ž., Antolić, A., Babić, I., Jurić, S. & Bojić, M. (2017). Quantitative Analysis of Phenolic Acids and Antiplatelet Activity of Melissa officinalis Leaf Extracts. Natural Product Communications, 12, 93–94.

NPC Natural Product Communications

2017
Vol. 12
No. 1
93 - 94

Quantitative Analysis of Phenolic Acids and Antiplatelet Activity of *Melissa officinalis* Leaf Extracts

Željan Maleš[a], Andrea Antolić[b], Ivana Babić[c], Sandra Jurić[a] and Mirza Bojić[a,*]

[a]*University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia*
[b]*University of Zagreb, Faculty of Science, PDS Biology, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia*
[c]*Croatian Institute of Transfusion Medicine, Petrova 4, 10000 Zagreb, Croatia*

mbojic@pharma.hr

Received: August 12th, 2016; Accepted: September 29th, 2016

The contents of total phenolic acids and rosmarinic acid were determined and the antiplatelet potential assessed of extracts of lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae) leaf samples collected during 2014 and 2015. The quantity of total phenolic acids ranged from 4.8 to 8.5%, while the rosmarinic acid content ranged from 1.78 to 4.35%. Results of statistical analysis showed that the undiluted extracts have antiplatelet activity in the ADP test (final concentration 31.25 mg/L). While there are reports on antiplatelet activity of lemon balm essential oil, to the best of our knowledge, this is the first report on antiplatelet activity of lemon balm leaf extracts.

Keywords: *Melissa officinalis*, Polyphenols, HPLC, Spectrophotometry, Antiplatelet activity.

Lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae) is an endogenous plant of western Asian regions and the Eastern Mediterranean, and is cultivated in almost all of Europe and North America [1]. It grows as a shrub, 0.3 to 0.9 m high, usually with several stems. The major chemical constituents are polyphenolic acids namely rosmarinic (most abundant), *p*-coumaric, caffeic and chlorogenic acids. Lemon balm essential oil (0.02-0.37%) is composed of more than 40% monoterpenes and more than 35% sesquiterpenes [2]. Other constituents determined in leaf samples include flavonoids, tannins and triterpenes [3]. Externally, lemon balm extracts are used for symptomatic treatment of herpes labialis while orally applied extracts act as a carminative and a sedative [1].

Antiplatelet activity, i.e. prevention of platelet aggregation, of polyphenols is of interest as it has been shown that they can act in submicromolar concentrations on platelet aggregation. This is a useful characteristic as polyphenols could serve as new sources of antiaggregatory drugs in prevention of cardiovascular diseases (e.g. prevention of thrombosis, heart attack or stroke). On the other hand, polyphenols from everyday diet could interfere with platelet functional tests and subsequently hinder diagnosis of platelet related disorders [4]. It has been shown that lemon balm essential oil has antiplatelet activity [5] that can be attributed to major terpene constituents [6,7]. As major constituents of lemon balm leaves are phenolic acids, primarily rosmarinic acid, the objective of this work was to determine the contents of total phenolic acids and rosmarinic acid, and the antiplatelet activity of ethanolic lemon balm leaf extracts.

Total phenolic acid concentrations ranged from 4.8 to 8.5% (Table 1) fulfilling the requirements of European Pharmacopeia (more than 4% of phenolic acids). Rosmarinic acid, as a major constituent, was determined by HPLC and its content ranged from 1.78 to 4.35% (Table 1).

Lemon balm ethanolic extracts (non-diluted, 10%, 1%) were tested for antiaggregatory activity in a thrombocyte functional test induced with adenosine diphosphate (ADP). Statistical analysis (one-way ANOVA with post hoc Tukey test) of the results showed that only the undiluted extracts had antiplatelet activity in the test (Figure 1). Standard rosmarinic acid was analyzed in concentrations of 0.09, 0.9, 9 and 90 μM. Only 90 μM rosmarinic acid solution showed statistically significant reduction of platelet aggregation.

Table 1: Content of total phenolic acids and rosmarinic acid.[a]

Sample	Total phenolic acids	Rosmarinic acid
1	6.5 ± 0.5	1.78 ± 0.02
2	7.1 ± 0.1	2.14 ± 0.02
3	4.8 ± 0.1	1.99 ± 0.01
4	8.5 ± 0.2	4.35 ± 0.02
5	6.5 ± 0.1	2.30 ± 0.02

[a]Results are expressed as percentage (± SD) of dry mass of leaf powder.

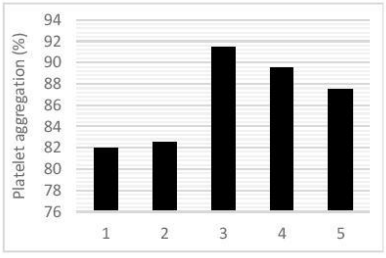


Figure 1: Antiaggregatory effect of *Melissa officinalis* leaf extracts (1-5) (see Table 1 for concentrations). Platelet aggregation is expressed as percentage to the solvent control.

To the best of our knowledge this is the first report of antiplatelet effect of lemon balm leaf extracts. This activity can be attributed mainly to rosmarinic acid as all extracts showed antiplatelet activity at concentrations of 50-120 μM (based on HPLC results, % rosmarinic acid {(see Table 1) *x* concentration of extract (1 mg/mL) / *M* (rosmarinic acid, 360.3 g/mol)}, which is comparable with 90 μM concentration of rosmarinic acid in the antiplatelet test.

Previously, lemon balm essential oil was shown to have an antiplatelet effect at a concentration of 4 μg/mL using collagen and thrombin as inducers of aggregation that was attributed to terpene constituents [5]. The lower results that we have observed can be attributed to the different chemical composition of the leaf extract compared with the essential oil. The advantage of our approach is that the analysis was on whole blood rather than platelet rich plasma used in the previous study [8].

Experimental

Plant material: Some of the leaf samples collected in 2014 and 2015 (samples 1 and 2) were cultivated in the Pharmaceutical Botanical Garden "Fran Kušan", Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, while the others (samples 3-5) were obtained from Suban (Strmec, Croatia). Voucher specimens are deposited in the Herbarium of the Department of Pharmaceutical Botany, University of Zagreb.

Determination of total phenolic acids: The content of phenolic acids in the plant samples was determined by the official Eur. Ph. method [3]. Extracts were prepared by reflux extraction of 0.2 g of the powdered drug with 190 mL of ethanol (50%, v/v) for 30 min. Filtrate and washings were collected and diluted to 200 mL with diluted ethanol. Total phenolic acid content was determined by measuring the absorbance of the complex formed between phenolic acids and sodium nitrite – sodium molybdate at 505 nm [9]. The measurements were carried out using a Varian Cary 50 Bio spectrophotometer (Varian Inc., USA). The content of phenolic acids was expressed as the equivalent of rosmarinic acid based on 3 independent analyses.

HPLC analysis of rosmarinic acid: Rosmarinic acid content was determined by reverse phase high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector on an Agilent 1100 system (Agilent, USA) using the method described by Medić-Šarić *et al.* [10]. Extracts used for determination of phenolic acids were filtered (Whatman 0.22 μm syringe filter, Sigma Aldrich, USA). A Zorbax SB-C18 (250 mm x 4.6 mm, particle size 5 μm) column with precolumn (12.5 mm x 4.6 mm, particle size 5 μm) was used as the stationary phase. Elution was achieved with a gradient of mobile phases A (water, methanol and formic acid in ratio 93:5:2) and B (water, methanol and formic acid in ratio 3:95:2) following the timetable (t/min, %B): (0, 20), (10, 40), (35, 50), (47, 50), (70, 80), (80, 20). Detection was based on retention time and UV spectra compared with standard; quantification was based on calibration curves recorded at 254 nm.

Determination of antiplatelet activity: Platelet aggregation was analyzed in whole blood utilizing a Multiplate® impedance analyzer (Roche, Switzerland). Blood samples were obtained from 9 healthy volunteers with their written consent. This study has been approved by the ethical committee of the Croatian Institute of Transfusion Medicine. The following procedure was used for all analyses: 300 μL of blood was incubated at 37°C for 6 min with 20 μL of lemon balm extract solution and 300 μL of saline with $CaCl_2$. Aggregation cascade was induced according to protocol by adding 20 μL of agonist ADP reagent (6.3 μM) [3]. Aggregation was measured for 6 min and expressed as area under the curve in arbitrary units (AU). Untreated samples (negative control, 100% of aggregation) were analyzed with 20 μL of solvent. All measurements were performed in triplicate. Final results for extracts were expressed as percentage of residual platelet aggregation compared with the untreated sample. Rosmarinic acid standard was used as positive control. Statistical analysis was performed using the Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) program; p values lower than $\alpha = 0.05$ were regarded as statistically significant.

Acknowledgments – We would like to thank V. Suban Jakuš for providing some of the lemon balms leaf samples. This work was in part supported by University of Zagreb (BM088-2015) and Croatian Science Foundation (UIP-2014-09-5704).

References

[1] *WHO Monographs on Selected Medicinal Plants - Volume 2*. (**2004**) World Health Organization, Geneva, CH, 180-187.
[2] Nurzyńska-Wierdak R, Bogucka-Kocka A, Szymczak G. (**2014**) Volatile constituents of *Melissa officinalis* leaves determined by plant age. *Natural Product Communications*, ***9***, 703-706.
[3] *European Pharmacopoeia*. (**2005**) 5th Ed. Council of Europe, Strasbourg Cedex, 01/2005, 1447.
[4] (a) Bojić M, Debeljak Z, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S. (**2011**) Evaluation of antiaggregatory activity of flavonoid aglycone series. *Nutrition Journal*, ***10***, 73, 1-8; (b) Bojić M, Debeljak Ž, Medić-Šarić M, Tomičić M. (**2012**) Interference of selected flavonoid aglycons in platelet aggregation assays. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, ***50***, 1403-1408.
[5] Yen HF, Wang SY, Wu CC, Lin WY, Wu TY, Chang FR, Wang CK. (**2012**) Cytotoxicity, anti-platelet aggregation assay and chemical components analysis of thirty-eight kinds of essential oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, ***20***, 478-483.
[6] Suschke U, Sporer F, Schneele J, Geiss HK, Reichling J. (**2007**) Antibacterial and cytotoxic activity of *Nepeta cataria* L., *N. cataria* var. *citriodora* (Beck.) Balb. and *Melissa officinalis* L. essential oils. *Natural Product Communications*, ***2***, 1277-1286.
[7] D'Angiolillo F, Tonelli M, Pellegrini E, Nali C, Lorenzini G, Pistelli L, Pistelli L. (**2015**) Can ozone alter the terpenoid composition and membrane integrity of *in vitro Melissa officinalis* shoots? *Natural Product Communications*, ***10***, 1055-1058.
[8] Chapado L, Linares-Palomino PJ, Salido S, Altarejos J, Rosado JA, Salido GM. (**2010**) Synthesis and evaluation of the platelet antiaggregant properties of phenolic antioxidants structurally related to rosmarinic acid. *Bioorganic Chemistry*, ***38***, 108-114.
[9] Medić-Šarić M, Rastija V, Bojić M, Maleš Ž. (**2009**) From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. *Nutrition Journal*, ***8***, 33, 1-18.
[10] Medić-Šarić M, Rastija V, Bojić M. (**2011**) Recent advances in the application of high-performance liquid chromatography in the analysis of polyphenols in wine and propolis. *Journal of AOAC International*, ***94***, 32-42.

Pterostilbene and Its Glucoside Induce Type XVII Collagen Expression
Hiroki Hamada, Kei Shimoda, Yoshiyuki Horio, Tsubasa Ono, Ryusuke Hosoda, Noriyuki Nakayama and Koichi Urano **85**

Metabolites from *Penicillium* sp. Associated with *Paris polyphylla*
Xiao-Zhan Li, Bao-Hui Ruan, Ya-Bin Yang, Xue-Qiong Yang, Guang-Yi Chen, Ming Hu, Bang-Yan Wang, Hao Zhou and Zhong-Tao Ding **87**

Ferulic Acid Esters of Oligo-glucose from *Allium macrostemon*
Ayaka Usui, Yosuke Matsuo, Takashi Tanaka, Kazusato Ohshima, Shinji Fukuda, Takara Mine, Hideyuki Nakayama and Kanji Ishimaru **89**

Quantitative Analysis of Phenolic Acids and Antiplatelet Activity of *Melissa officinalis* Leaf Extracts
Željan Maleš, Andrea Antolić, Ivana Babić, Sandra Jurić and Mirza Bojić **93**

A Concise Synthesis of Rhodanthpyrone A and B, Natural 4-(Hydroxyphenyl)-substituted α-Pyrones
Young Taek Han **95**

A New Lignan from the Leaves of *Zanthoxylum armatum*
Vinod Bhatt, Sushila Sharma, Neeraj Kumar and Bikram Singh **99**

Production of Podophyllotoxin by Plant Tissue Cultures of *Juniperus virginiana*
Marie Kašparová, Jan Martin, Lenka Tůmová and Jiřina Spilková **101**

New Data on Vanillin-Based Isothiazolic Insecticide Synergists
Alexey V. Kletskov, Vladimir I. Potkin, Evgenij A. Dikusar and Romualda M. Zolotar **105**

Phileucin - A Cyclic Dipeptide Similar to Phevalin (Aureusimine B) from *Streptomyces coelicolor* M1146
Nils Böhringer, Michael Gütschow, Gabriele M. König and Till F. Schäberle **107**

OM-X®, a Fermented Vegetables Extract, Facilitates Muscle Endurance Capacity in Swimming Exercise Mice
Tomohiro Itoh, Yasuyoshi Miyake, Takayuki Yamaguchi, Shota Tsukaguchi, Rena Mitarai, Miyuki Enomoto, Seiya Ensho, Yoshie Shimomiya, Yuki Nakamura, Masashi Ando, Yasuyuki Tsukamasa and Muneaki Takahata **111**

Essential Oils of *Morus alba* and *M. nigra* Leaves: Effect of Drying on the Chemical Composition
Niko S. Radulović, Vojkan M. Miljković, Marko Z. Mladenović and Goran S. Nikolić **115**

Vibrational and Thermal Studies of Essential Oils Derived from *Cistus ladanifer* and *Erica arborea* Shrubs
Paula Carrión-Prieto, Pablo Martín-Ramos, Teresa M.R. Maria, Salvador Hernández-Navarro, Fermín Garrido-Laurnaga, M. Ermelinda S. Eusébio and Jesús Martín-Gil **119**

Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Phellodendron lavallei*
Anna Lis, Weronika Kowalska, Monika Sienkiewicz and Piotr Banaszczak **123**

Antimicrobial Potential of *Rosmarinus officinalis* Commercial Essential Oil in the Treatment of Vaginal Infections in Pregnant Women
Mirjana A. Bogavac, Maja A. Karaman, Jan J. Suđi, Bojan B. Radovanović, Ljiljana N. Janjušević, Nenad B. Ćetković and Kristina D. Tešanović **127**

Chemical Profile and *in vitro* Biological Activities of Essential Oils of *Nectandra puberula* and *N. cuspidata* from the Amazon
Joyce Kelly R. da Silva, Eloísa Helena A. Andrade, Rosa Helena V. Mourão, José Guilherme S. Maia, Noura S. Dosoky and William N. Setzer **131**

Chemical Composition and Acaricidal Activity of *Thymus algeriensis* Essential Oil against *Varroa destructor*
Benmoussa Kouache, Moussa Brada, Abdelkader Saadi, Marie Laure Fauconnier, Georges Lognay and Stephanie Heuskin **135**

Accounts/Reviews

Cereal Lignans, Natural Compounds of Interest for Human Health?
Isabella Zanella, Giorgio Biasiotto, Finn Holm and Diego di Lorenzo **139**

The Rare Amino Acid Building Block 3-(3-furyl)-Alanine in the Formation of Non-ribosomal Peptides
Fayrouz El Maddah, Mamona Nazir and Gabriele M. König **147**

Natural Product Communications
2017
Volume 12, Number 1

Contents

Original Paper	***Page***
Cytotoxic and Antileishmanial Components from the Bark Extract of *Ruyschia phylladenia* from Monteverde, Costa Rica Kelly Marie Steinberg, Samon Shrestha, Noura S. Dosoky, Lianet Monzote, Abel Piñón, William A. Haber and William N. Setzer	1
A New Cardenolide and Other Compounds from *Salsola tetragona* Hamida Ghorab, Abdelkrim Khettaf, Meriem Lehbili, Ahmed Kabouche, Abdulmagid Alabdul Magid, Dominique Harakat, Laurence Voutquenne-Nazabadioko and Zahia Kabouche	3
Quantification of Saponins in *Asparagus racemosus* by HPLC-Q-TOF-MS/MS Churanya Onlom, Nitra Nuengchamnong, Watoo Phrompittayarat, Waraporn Putalun, Neti Waranuch and Kornkanok Ingkaninan	7
New Alkaloids and Anti-inflammatory Constituents from the Leaves of *Antidesma ghaesembilla* Phan Van Kiem, Le Canh Viet Cuong, Do Thi Trang, Nguyen Xuan Nhiem, Hoang Le Tuan Anh, Bui Huu Tai, Le Mai Huong, Chau Van Minh, Taek Hwan Lee, Sun Yeou Kim and Seung Hyun Kim	11
Chemical Characterization of *Narcissus poeticus* from Sirente –Velino (Apennines - Italy): Galantamine Accumulation and Distribution of Allergenic Compounds in the Flower Donatella Ferri, Carla Ubaldi, Giordana Marcozzi, Paolo Fasciani, Loretta Bacchetta and Loretta Pace	15
A New Imidazole from the Sponge *Dercitus (Halinastra) japonensis* Hiromi Hirade, Takahiro Haruyama, Nobuyuki Kobayashi, Nicole J. de Voogd and Junichi Tanaka	19
Acetyl-cholinesterase Inhibitory Activity of Methoxyflavones Isolated from *Kaempferia parviflora* Sang-Hwan Seo, Young-Choon Lee and Hyung-In Moon	21
Antimutagenic Effects of Polymethoxy Flavonoids of *Citrus unshiu* Takahiro Matsumoto, Taisuke Nishikawa, Ayano Furukawa, Saki Itano, Yuka Tamura, Tomohiro Hasei and Tetsushi Watanabe	23
Application of Mixture Analysis to Crude Materials from Natural Resources (V) [1]: Discrimination of *Glycyrrhiza uralensis* and *G. glabra* by EI mass spectrometry Masaki Baba, Eriko Fukuda, Yoshihiro Uesawa, Hisahiro Kai, Koji Matsuno and Yoshihito Okada	27
Comparison of the Qualitative Chemical Composition of Extracts from *Ageratina havanensis* Collected in Two Different Phenological Stages by FIA-ESI-IT-MS^n and UPLC/ESI-MS^n: Antiviral Activity Trina H. Garcia, Claudia Quintino da Rocha, Marcelo J. Dias, Liudis L. Pino, Gloria del Barrio, Annele Roque, Caridad E. Pérez, Lourdes Campaner dos Santos, Iraida Spengler and Wagner Vilegas	31
Characterization of the Polyphenolic Profiles of Peel, Flesh and Leaves of *Malus domestica* Cultivars Using UHPLC-DAD-HESI-MS^n Ana Petkovska, Viktor Gjamovski, Jasmina Petreska Stanoeva and Marina Stefova	35
Preparation and Validated Analysis of Anthocyanin Concentrate from the Calyces of *Hibiscus sabdariffa* Lubomir Opletal, Lucie Chocholousova-Havlikova, Tomas Siatka, Lucie Cahlíková, Miroslav Locarek, Badreldin H. Ali, Priyadarshini Manoj, Aishwarya Ramkumar, Yousuf M. Al Suleimani, Mohammed Al Za'abi, Turan Karaca and Abderrahim Nemmar	43
The Influence of Extraction Parameters on Antimicrobial Activity of Propolis Extracts Mario Jug, Ognjen Karas and Ivan Kosalec	47
Comparative Evaluation of Phytochemicals, and Antidiabetic and Antioxidant Activities of *Cuscuta reflexa* Grown on Different Hosts in Northern Thailand Keerati Tanruean, Khwanta Kaewnarin, Nakarin Suwannarach and Saisamorn Lumyong	51
Chemical Composition, Antioxidant and Anticholinesterase Activities of *Gentianella azurea* from Russian Federation Daniil N. Olennikov, Nadezhda K. Chirikova and Cecile Vennos	55
Constituents of Fermented Male Flowers of *Alnus sieboldiana* (Betulaceae) Nurunajah Ab Ghani, Nor Hadiani Ismail and Yoshinori Asakawa	57
Secondary Metabolites from the Leaves of *Digitalis viridiflora* Hasan Kırmızıbekmez, Norbert Kúsz, Nursenem Karaca, Fatih Demirci and Judit Hohmann	59
(±)-Perforison A, A Pair of New Chromone Enantiomers from *Harrisonia perforata* Wen-Juan Yuan, Wen-Fen Gao, Jia-Hui Zhang, Pei Cao, Yu Zhang, Duo-Zhi Chen, Shun-Lin Li, Ying-Tong Di and Xiao-Jiang Hao	63
Antiinflammatory and Analgesic Effects in Rodent Models of Ethanol Extract of *Clausena anisata* Roots and their Chemical Constituents Emmanuel Kofi Kumatia, Kofi Annan, Rita Akosua Dickson, Abraham Yeboah Mensah, Isaac Kingsley Amponsah, Alfred A. Appiah, Nguyen Hu Tung, Dominic Adotey Edoh and Solomon Habtemariam	67
Preventive Effects of Resveratrol-enriched Extract of Peanut Sprout on Bacteria- and Estradiol-induced Prostatitis in Mice Kyoung-Ho Pyo, You-Won Lee, Sang-Hoon Lee, Chun-Feng Xin, Ji-Hun Shin and Eun Hee Shin	73
Phenanthrenes from *Eulophia macrobulbon* as Novel Phosphodiesterase-5 Inhibitors Prapapan Temkitthawon, Kanokwan Changwichit, Nantaka Khorana, Jarupa Viyoch, Khanit Suwanborirux and Kornkanok Ingkaninan	79
Bioactive Glucitol-Core Containing Gallotannins and other Phytochemicals from Silver Maple (*Acer saccharinum*) Leaves Abdullatif Bin Muhsinah, Hang Ma, Nicholas A. DaSilva, Tao Yuan and Navindra P. Seeram	83

Continued inside backcover

10 ŽIVOTOPIS

Ivana Babić rođena je 3. lipnja 1974. godine u Zagrebu, gdje je pohađala osnovnu školu i Centar za upravu i pravosuđe. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, smjer medicinska biokemija, upisuje 1992. godine a završava diplomskim radom pod nazivom Dokazivanje HLA – C alela u hrvatskoj populaciji pomoću polimerazne lančane reakcije, 1997. godine. Diplomski rad izrađen je na Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, pod vodstvom doc. dr. sc. Blaženke Grahovac i prof. dr. sc. Berislava Pendea pri Katedri za medicinsku biokemiju. Stručni staž obavlja u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, gdje se i zapošljava 1998. godine i radi do danas u Odjelu za molekularnu dijagnostiku. Godine 2008. upisuje doktorski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Sudionik je brojnih inozemnih i domaćih kongresa s ukupno 24 posterska priopćenja. Održala je 9 javnih predavanja na kongresima i simpozijima. Prvi je autor dva rada, a koautor 6 znanstvenih i stručnih radova. U Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu 2013. godine postaje voditelj Odsjeka NAT testiranje DDK u sklopu Odjela za molekularnu dijagnostiku.

Objavljeni znanstveni radovi:

Babić, I., Bojić, M., Maleš, Ž., Zadro, R., Gojčeta, K., Duka, I., Rimac, H. & Jukić, I. (2019). Influence of flavonoids' lipophilicity on platelet aggregation. *Acta Pharm.*, **69**, 607–619.

Babic, I., Maslovic, M., Vuk, T., Stanic, H.S., Sestan, P.T., Kursar, M., Bingulac-Popovic, J., Dogic, V. & Jukic, I. (2017). Detection of three blood donors with multiple myeloma by routine viral individual-donor nucleic acid testing screening. *Transfusion,* **57**, 2813–2814.

Bojić, M., Maleš, Ž., Antolić, A., Babić, I. & Tomičić, M. (2019). Antithrombotic activity of flavonoids and polyphenols rich plant species. *Acta Pharm.*, **69**, 483–495.

Dražić, V., Marković, S., Bingulac-Popović, J., Babić, I. & Grahovac, B. (2006). Isolation of hepatitis G virus in Croatia. *Biochemia medica,* **10**, 181–185.

Jukić, I., Bingulac-Popović, J., Đogić, V., Babić, I., Culej, J., Tomičić, M., Vuk, T., Šarlija, D. & Balija, M. (2009). ABO Blood Groups and Genetic Risk Factors for Thrombosis in Croatian Population. *Croatian Medical Journal,* **50**, 550–558.

Jukic, I., Bingulac-Popovic, J., Dogic, V., Hecimovic, A., Babic, I., Batarilo, I., Maglov, C. & Sturm, D. (2013). Evaluation of ABO blood groups as a risk factor for myocardial infarction. *Blood Transfusion*, **11**, 464–465.

Maleš, Ž., Antolić, A., Babić, I., Jurić, S. & Bojić, M. (2017). Quantitative Analysis of Phenolic Acids and Antiplatelet Activity of Melissa officinalis Leaf Extracts. *Natural Product Communications*, **12**, 93–94.

Stanic, H.S., Babic, I., Maslovic, M., Dogic, V., Bingulac-Popovic, J., Miletic, M., Jurakovic-Loncar, N., Vuk, T., Strauss-Patko, M. & Jukic, I. (2017). Three-Year Experience in NAT Screening of Blood Donors for Transfusion Transmitted Viruses in Croatia. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **44**, 415–420.

11 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku kemiju
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

ANTIAGREGACIJSKO DJELOVANJE FLAVONOIDA

Ivana Babić

SAŽETAK

Flavonoidi su heterociklički spojevi iz prirode koje unosimo hranom. Antiagregacijska terapija u kardiovaskularnim oboljenjima ima ozbiljne nuspojave krvarenja u gastrointestinalni trakt. Flavonoidi pokazuju antiagregacijsko djelovanje, čiji mehanizam nije rasvijetljen. Njegovo razumijevanje omogućilo bi upotrebu flavonoida kao dostupne i neškodljive opcije u antiagregacijskoj terapiji. Određeni su kromatografski parametri lipofilnosti 21 flavonoida: parametri retencijski faktor R_F i hidrofobni parametar R_M. Vrijednosti R_M uspoređene su s logaritmom koeficijenta razdijeljenja, log*P*, dobivenim putem programskih aplikacija. Impedancijskom agregometrijom, određene su minimalna antiagregacijska koncentracija, flavanona, te ispitano pojačano antiagregacijsko djelovanje inhibitora enzima fosfolipaze C, ciklooksigenaze i inhibitora Ca^{2+}-kanala u prisutnosti flavanona, te antiagregacijsko djelovanje kombinacija flavanona, 6-hidroksiflavona i pinocembrin-7-metiletera. Protočnom citometrijom ispitano je smanjenje aktivacije trombocita nakon inkubacije s flavanonom, praćenjem ekspresije aktivnog oblika integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Kromatografski parametri R_M, bili su u rasponu od -0,5942 za luteolin do 0,5202 za tektokrizin i krizin-dimetileter. Snažna pozitivna korelaciju prisutna je za log*P* programskih aplikacija i R_M (r 0,66-0,93 p <0.05). Flavanon postiže izuzetno niske minimalne antiagregacijske koncentracije, značajno pridonosi djelovanju inhibitora enzima fosfolipaze C, te nešto slabije inhibitoru Ca^{2+} kanala dok djelovanju inhibitora ciklooksigenaze ne pridonosi. U kombinacijama s drugim flavonoidima, flavanon ostvaruje značajno povećan antiagregacijski učinak. Djelovanjem flavanona smanjena je aktivacija integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. Lipofilnost i djelovanje na fosfolipazu C omogućuju sveobuhvatnost antiagregacijskog djelovanja flavonoida, a uz minimalne antiagregacijske koncentracije flavanona ostvarive prehranom kao i pojačano djelovanje kombinacije flavonoida predstavljaju osnovu njihove moguće primjene u antiagregacijskoj terapiji.

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

Rad sadrži: 87 stranica, 25 slika, 11 tablica i 173 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi: Flavonoidi, flavanon, log*P*, R_M, lipofilnost, impedancijska agregometrija, PLC, COX-1, kalcijevi kanali, inhibitori, protočna citometrija, PAC-1
Mentori: **Dr. sc. Mirza Bojić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Renata Zadro, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Ocjenjivači: **Dr. sc. Željan Maleš**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Karmela Barišić, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Mila Lovrić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Rad prihvaćen: 22.1.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Doctoral thesis**
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medicinal Chemistry
Department of Medicinal Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

ANTIAGGREGATORY EFFECT OF FLAVONOIDS

Ivana Babić

SUMMARY

Flavonoids are heterocyclic compounds found in nature which we consume true everyday diet. Antiplatelet therapy has serious side-effects as bleeding in the gastrointestinal tract. Flavonoids exhibit antiaggregatory effect, with not fully enlightened mechanism. Understanding of this mechanism would allow the use of flavonoids as available and innocuous options in antiplatelet therapy. The chromatographic parameters, retention factor R_F and the hydrophobic parameter R_M were determined as the lipophilic parameters of flavonoids. The R_M values were compared to the logarithm of log of coefficient of partition, obtained through program applications. Impedance aggregometry was used to determine the minimum antiaggregating concentration of flavanone and to investigate the enhanced activity of phospholipase C, cyclooxygenase and Ca^{2+} channel blockers in the presence of flavanones, and the antiaggregatory action of a combination of flavanone, 6-hydroxyphlavone and pinocembrin-7-methylether. Flow cytometry was used to monitor the expression of activated conformation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ after incubation of platelets with flavanone. The chromatographic parameters of R_M ranged from -0.5942 for luteolin to 0.5202 for tectocrysine and chrysine-dimethylether. Strong positive correlation is present for log*P* derived thru program applications and R_M (r 0.66-0.93 p <0.05). Flavanon achieves extremely low minimum antiaggregating concentrations, significantly contributes to the inhibition of phospholipase C enzyme and a slightly less to activity of Ca^{2+} channel blockers while it doesn't contribute to the action of cyclooxygenase inhibitor. In combination with other flavonoids, flavanone achieves significant antiaggregating effect. Flavanone decreased the activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Lipophilicity and interaction with phospholipase C, enable the antiaggregatory action of flavonoids. They, as well as minimal antiaggregating concentrations achievable by diet and enhanced action of flavonoid combinations represent the basis for their possible use option in antiplatelet therapy.

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

Thesis includes: 87 pages, 25 figures, 11 tables, 173 references. Original is in Croatian language.

Keywords: flavonoids, flavanone, log*P*, R_M, lipophilicity, impedance aggregometry, PLC, COX-1, calcium channels, inhibitors, flow cytometry, PAC-1

Mentors: **Mirza Bojić**, **PhD,** *Associate professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Renata Zadro, **PhD**, *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Željan Maleš, PhD,** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Renata Zadro, PhD, *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mila Lovrić, PhD, *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted**:** 22.1.2020.