

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivan Čolić

Antioksidativni status plazme, eritrocita i trombocita nakon
primjene antihemostatskih lijekova i vazodilatacijskih
suplemenata

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr.sc. Domogoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

ANTIOKSIDATIVNI STATUS PLAZME, ERITROCITA I TROMBOCITA NAKON PRIMJENE ANTIHEMOSTATSKIH LIJEKOVA I VAZODILATACIJSKIH SUPLEMENATA

Ivan Čolić

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U istraživanju se pratila promjena antioksidativnog statusa u plazmi, trombocitima i eritrocitima krvi štakora nakon primjene antihemostatskih lijekova i vazodilatacijskih suplemenata zasebno i u kombinaciji. U pokusu je bilo 9 skupina pod tretmanom i jedna kontrolna skupina. Skupine pod tretmanom bile su skupine: 1. Ginko, 2. Vulkan, 3. Salicilna kiselina, 4. Varfarin, 5. Vulkan+varfarin, 6. Vulkan + salicilna kiselina, 7. Ginko + varfarin, 8. Ginko + salicilna te 9. Ginkalert. Uz 9 skupina pod tretmanom bila je i kontrolna skupina 0. Životinje su tretirane kroz razdoblje od 28 dana, prema preporučenom toksikološkom protokolu OECD 407 nakon čega su žrtvovane i uzeti uzorci krvi. Nakon centrifugiranja i odvajanja komponenti krvi izmjereni su markeri antioksidativnog sustava: superoksid dismutazu (SOD), glutation (GSH), katalazu (CAT) te malondialdehid (MDA). Ovo istraživanje je potvrdilo da postoji niz mogućih interakcija između vazodilatacijskih suplemenata i primjene antihemostatskih lijekova, koje dovode do velikih promjena u antioksidativnom statusu organizma. Stoga je potrebno ograničiti istovremenu primjenu antihemostatika i vazodilatacijskih suplemenata prehrani kako bi spriječili moguće štetne posljedice.

(47 stranice, 14 slika, 16 tablica, 46 literarnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: ginkgo, varfarin, antioksidans, aspirin, SOD, GSH, MDA

Voditelj: Dr. Sc. Domagoj Đikić, izv. prof.

Ocjenitelji: Dr. Sc. Renata Matonićkin Kepčija, izv. prof

Dr. Sc. Martina Šeruga Musić, doc.

Rad prihvaćen: 10. 7. 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

ANTIOXIDANT STATUS IN PLASMA, ERYTHROCYTES AND PLATELETS FOLLOWING THE USE OF ANTIHEMOSTATIC DRUGS AND VASODILATION SUPPLEMENTS

Ivan Čolić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The study monitored the changes in antioxidant status of plasma, platelets and red blood cells of rat blood after administration of antihemostatic drugs and vasodilating supplements alone and in combination. The experiment was composed of 9 groups under treatment and one control group. The groups under treatment were the groups: 1. Ginkgo, 2. Vulkan, 3. Salicilna, 4. Warfarin, 5. Vulkan+warfarin, 6. Vulkan+salicilna, 7. Ginko + warfarin, 8. Ginko + and 9. Ginkalert. Nine groups under treatment and the control group animals were treated over a period of 28 days, according to the recommended OECD 407 toxicological protocol. The animals were sacrificed and blood samples were taken. After centrifugation and separation of blood components the markers of antioxidant system, superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) were measured. This research has confirmed that there are a number of possible interactions between applying vasodilating supplements and antihemostatic drugs, which led to big changes in the antioxidant status of the organism. Obtained results suggest it is necessary to confine the simultaneous application of antihemostatic drugs and vasodilating supplements in order to prevent possible harmful effects.

(47 pages, 14 figures, 16 tables, 46 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: ginkgo, warfarin, antioxidant, aspirin, SOD, GSH, MDA

Supervisor: Dr. Domagoj Đikić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Renata Matonićkin Kepčija, Assoc. Prof.

Dr. Martina Šeruga Musić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 10. 7. 2014.

Sadržaj

1.1. Oksidativni stres i antioksidativni sustav	1
1.1.1. Superoksid dismutaza (SOD).....	3
1.1.2. Katalaza.....	3
1.1.3. Glutation peroksidaza (GPx).....	3
1.2. Krv i plazma	4
1.2.1. Eritrociti	4
1.2.2. Trombociti.....	5
1.2.3. Plazma.....	6
1.3. Antihemostatici.....	7
1.3.1. Varfarin	7
1.3.2. Acetilsalicilna kiselina	9
1.4. Dodaci prehrani	10
1.4.1. Ginkgo biloba.....	10
1.4.2. Vulkan.....	11
1.4.3. Gotu kola (<i>Centella asiatica</i>).....	12
1.4.4. Borovnica (<i>Vaccinium Myrtillus</i>)	12
1.5. Cilj istraživanja.....	13
2. Materijali i metode	14
2.1. Tretiranje životinja	14
2.2. Izolacija i priprema tkiva	14
2.3. Određivanje proteina metodom po Lowery-u	16
2.4. Mjerenje hemoglobina u eritrocitima	16
2.5. Mjerenje koncentracije ukupnog glutaciona (GSH).....	17
2.6. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD).....	18
2.7. Mjerenje enzimatske aktivnosti katalaze	18
2.8. Mjerenje količine lipidne peroksidacije	19
2.9. Statistička obrada	19
3. Rezultati	21
3.1. Ukupni proteini u plazmi.....	21
3.2. Aktivnost SOD-a u uzorcima	22
3.3. Aktivnost katalaze u uzorcima	26

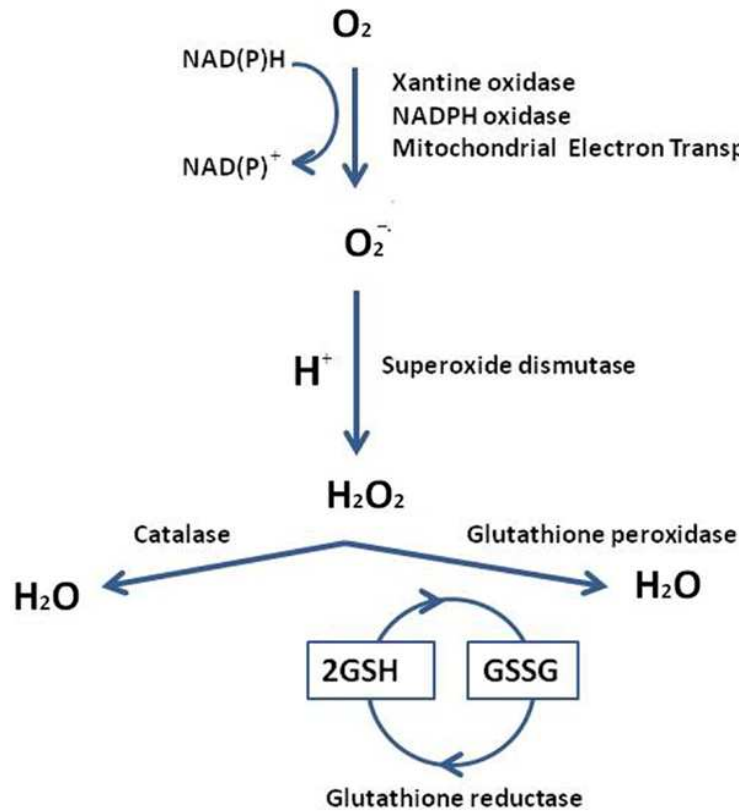
3.3. Koncentracija GSH.....	30
3.4. Koncentracija MDA u RBC	34
3.5. Sročeni prikaz promjena u uzorcima	35
4. Rasprava	39
5. Zaključci.....	42
6. Literatura	43

1. Uvod

1.1. Oksidativni stres i antioksidativni sustav

Oksidativni stres je pojam koji se odnosi na neravnotežu između produkcije oksidansa i obrambenog sustava organizma. Oksidativni stres je povezan sa procesom starenja i različitim kroničnim oboljenjima kao što su ateroskleroza i dijabetes, dok je prehrana voćem i povrćem bogatim sa antioksidansima kao što su polifenoli, vitamin C i karotenoidi povezana sa smanjenim rizikom pojave takvih kroničnih oboljenja (Preedy 2014.). U oksidanse ubrajamo reaktivne kisikove radikale (ROS), reaktivne dušikove radikale (RON), sulfatne radikale i druge. Oksidansi mogu nastati kao posljedica ionizirajućeg zračenja, kemijskih reakcija, enzimatskih reakcija, kroz redoks-katalizu koja uključuje prijenos slobodnih metalnih iona ili kao posljedica metala vezanih za enzime. U najbitnije stanične izvore oksidativnog stresa ubrajamo stvaranje ROS prilikom nepotpune redukcije kisika u respiratornom lancu mitohondrija kao i obrambeni sustav organizma koji uključuje oksidativan prasak posredovan NADPH oksidazom pri čemu nastaju superoksidni radikali (O_2^-) i mijeloperoksidaze što dovodi do stvaranja hipokloritne kiseline (Lovrić i sur. 2008.). U svrhu obrane od oksidativnih oštećenja organizam je razvio kompleksan antioksidativan sustav koji pomaže u očuvanju homeostaze organizma (Slika 1.). Prva linija obrane u tom antioksidativnom sustavu jest prevencija stvaranja oksidansa. Živi organizmi su razvili niz strategija kako bi se zaštitili od stvaranja oksidativnih radikala, počevši od planktona u moru koji se spušta dublje od razine mora kako bi smanjio razinu sunčevog zračenja, do pakiranja DNA u kromatin kako bi se zaštitio genetički materijal. Evolucijski su se razvili i mehanizmi koji sprječavaju inicijaciju lančanih reakcija vezujući metalne ione kao što su željezni i bakreni ioni. Tako je keliranje metalnih iona izrazito bitno u kontroliranju lipidne peroksidacije i DNA fragmentacije. Stoga su metal-vezujući proteini kao što su feritin, transferitin, ceruloplasmin, metalotionein i drugi izrazito bitni u kontroli stvaranja reaktivnih radikala. U prevenciji stvaranja kaskadnih reakcija i reaktivnih radikala bitni su i enzimatski sustavi u stanicama i tjelesnim tekućinama. Bitna skupina takvih enzima su glutation-S-transferaze. Ovi enzimi kataliziraju stvaranje tioetera (zvanih S-konjugati) sa reaktivnim elektrofilima iz tiola i glutationa, nastalih iz niza metaboličkih puteva poglavito onih koji uključuju citokrom P450. Druga linija obrane je hvatanje već nastalih reaktivnih radikala. Ovaj dio antioksidativnog sustava zadužen je za deaktivaciju i prijenos reaktivnih radikala od osjetljivih dijelova stanice do kompartimenata. Deaktivacija reaktivnih radikala se sastoji od formiranja neradikalnih i nereaktivnih krajnjih

produkata. Dok prijenos reaktivnih radikala u kompartimente podrazumijeva prijenos oksidansa iz hidrofobne faze u vodenu fazu, kao npr. prijenos od membrane u citosol ili prijenos od lipoproteina do vodene faze plazme. Uz ova dva mehanizma sve eukariotske stanice posjeduju snažne antioksidativne enzime. Tri najbitnija antioksidativna enzima su superoksid dismutaza (SOD), katalaza i glutation peroksidaza (Sies H. 1997.).



Slika 1. Shematski prikaz enzimatskog djelovanja, enzima antioksidativnog sustava (Preuzeto od: <http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/3544/>)

1.1.1. Superoksid dismutaza (SOD)

SOD je enzim koji ima važnu ulogu u obrambenom mehanizmu stanica izloženih kisiku. SOD katalizira dismutaciju superoksidnog radikala (O_2^-) u jednu molekulu kisika i vodikov peroksid. U sisavaca postoje tri vrste SOD-a ovisno o metalnom ionu koji sadrže. Cu/Zn-SOD (SOD1) je oblik SOD-a kojeg možemo naći u citoplazmi, lizosomima i jezgrinim kompartmentima stanica sisavaca. Ljudski SOD1 je homodimer koji sadrži Zn i Cu podjedinice građene od 153 aminokiseline. U stanicama susrećemo i Mn-SOD (SOD2) koji se nalazi u matriksu mitohondrija. Po građi je heterodimer koji se sastoji od jedne Mn podjedinice sa aktivnim središtem. SOD2 najveću razinu aktivnosti postiže u stanicama bubrežnog korteksa. Uz SOD1 i SOD2 postoji još i ekstracelularni (EC)-SOD (SOD) kojeg susrećemo u vanstaničnim tekućinama kao što su plazma i limfa. Građen je od Zn i Cu podjedinice te sadrži domenu sa visokim afinitetom za heparin, što doprinosi njegovoj lokalizaciju u vanstaničnim tekućinama (Miyamoto i sur. 2010.).

1.1.2. Katalaza

Katalaza je jedan od prvih izoliranih enzima sa molekulom željeza u aktivnom središtu. Po građi je tetramer sa četiri identične podjedinice od koji svaka sadrži jednu hem skupinu i NADPH u svome aktivnom središtu. Katalaza ima dva enzimatska djelovanja ovisno o koncentracijama H_2O_2 . Ako je razina H_2O_2 visoka, kao posljedica formiranja H_2O_2 djelovanjem SOD-a i/ili drugih procesa, hem skupina iz katalaze će katalizirati prijelaz H_2O_2 u H_2O i O_2 . Suprotno tome pri niskim koncentracijama H_2O_2 i u prisutnosti pogodnog donora vodika (npr. etanol, metanol, fenoli) katalaza djeluje peroksidativno, tako da ukloni H_2O_2 , ali pritom oksidira supstrat (Ścibior i sur. 2006., Berg i sur. 2002.).

1.1.3. Glutation peroksidaza (GPx)

Glutation peroksidaza (GPx) je glikoprotein koji sadrži jedan selen-cisteinski ostatak na aktivnom mjestu svoje podjedinice. GPx katalizira redukciju vodikovog peroksida i lipidnih hidroperoksida do vode i alkohola. Za tu reakciju potreban je glutation (GSH), tripeptid rasprostranjen u biljnom i životinjskom svijetu. GSH služi kao donor elektrona pri čemu se oksidira do glutationdisulfida (GSSG). Uz funkciju elektron donora GSH ima i bitnu ulogu kao nukleofilni kosupstrat za enzim glutation transferazu prilikom detoksifikacije

ksenobiotika (Baille i sur. 1991.). GPx ima nekoliko izoenzima koji se razlikuju u strukturi (aminokiselinski slijed i podjedinice), raspodijeli unutar organizma (jetra, bubrezi, eritrociti, plazma i druga tkiva), lokalizaciji enzima (citoplazma, probavni sustav, vanstanična tekućina) i specifičnosti za supstrat (vodikov peroksid i lipidni hidroperoksidi) (Miyamoto i sur. 2010.).

1.2. Krv i plazma

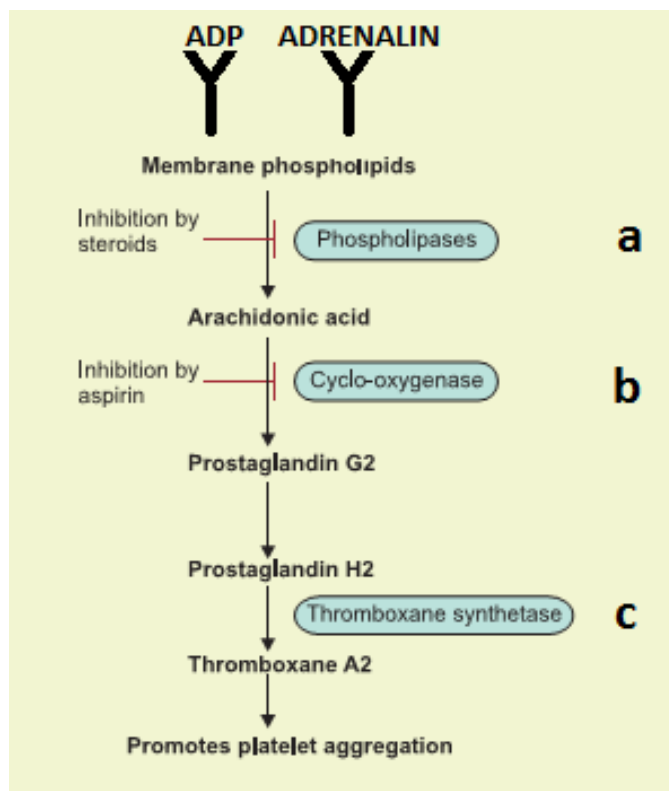
Krv je jedino tekuće tkivo koje kola kroz krvožilni sustav organizma te na taj način prenosi hranjive tvari i kisik u sve dijelove tijela. Sastoji se od krvne plazme i krvnih stanica eritrocita (crvene krvne stanice), leukocita (bijeke krvne stanice) i trombocita.

1.2.1. Eritrociti

Eritrociti su crvene krvne stanice koje nastaju procesom eritropoeze u koštanoj srži, a nakon prosječnog životnog vijeka od 120 dana razgrađuju se u koštanoj srži, slezeni ili jetri. Zreli eritrociti su okrugli bikonkavni diskovi promjera 7-8 μm , a glavna funkcija im je prijenos plinova O_2 i CO_2 . Izvana su obavijeni lipidnom membranom koja u svojoj građi sadrži veliki broj proteina i nešto malo ugljikohidrata. Unutar eritrocita nalazimo metaloprotein hemoglobin odgovoran za prijenos O_2 od pluća prema tkivu i za prijenos CO_2 od tkiva prema plućima. Hemoglobin je građena od hem i globinskog dijela. Globinski dio je građen od 4 polipeptidna lanca na čijim se vrhovima nalaze hem skupine. Uz hemoglobin u eritrocitima nalazimo i razne enzime koji sudjeluju u nekoliko metaboličkih puteva. Primarni izvor energije u eritrocitima je glikoliza. Zreloj stanici je potrebna energija kako bi sačuvala integritet stanične membrane, za aktivni transport kationa, za očuvanje nukleotida i sintezu glutaciona (GSH). Uz glikolizu u eritrocitima postoji još nekoliko metaboličkih puteva kao što je put pentoza fosfata u kojem glukoza-6-fosfat dehidrogenaza i 6-fosfoglukonat dehidrogenaza ciklički stvaraju NADPH iz NADP^+ . NADPH i enzim glutation reduktaza potrebni su eritrocitima za regeneraciju reduciranog GSH iz GSSG, kako bi GSH sa GPx moga vršiti detoksifikaciju vodikovog peroksida i time štiti hemoglobin od oksidativnih oštećenja (Kawthalkar 2006.). Uz GPx i glutation reduktazu od antioksidativnih enzima u eritrocitima nalazimo SOD i katalazu (Mansour i sur 2009.).

1.2.2. Trombociti

Trombociti nastaju iz megakariocita koje nalazimo u koštanoj srži. Promjera su 2-3 μ m, a u cirkulaciji preživljavaju do 10 dana. Jedna trećina ukupnih trombocita zadržava se u slezeni dok se ostali trombociti nalaze u perifernoj krvi. Ultrastrukturno možemo raspoznati 3 zone u građi trombocita, a to su periferna zona (glikokaliks, stanična membrana i otvoreni kanalni sustav), sol-gel zona (mikrofilamenti, cirkumferencijalni mikrotubuli i gusti tubularni sustav) te zona organela (alfa granule, guste granule, mitohondriji i lizosomi). Na svojoj staničnoj membrani sadrže različite glikoproteine koji su bitni za njihovu ulogu u održavanju hemostaze. Promjene u hemostazi (npr. vaskularna oštećenja) za posljedicu ima stimulaciju trombocita što dovodi do njihove aktivacije. Aktivacija trombocita podrazumijeva adheziju, agregaciju i sekreciju trombocita. Neposredno nakon adhezije i promjene oblika membrane slijedi sekrecija. Prilikom sekrecije dolazi do ispuštanja sadržaja iz organela trombocita. Otpuštanje trombocitnog faktora 4 dovodi do neutralizacije antikoagulativnog djelovanja heparina dok otpuštanje trombocitnog faktora rasta dovodi do stimulacije proliferacije vaskularnih glatkih mišićnih stanica. Uz trombocitni faktor 4 i trombocitni faktor rasta trombociti sintetiziraju i luče trombocitni agonist tromboksan A₂ (TAX2) (Slika 2.). Adhezija trombocita je prihvaćanje na neendotelnu površinu, poglavito subepitel koji je otkriven uslijed vaskularnog oštećenja. Pojam agregacije trombocita se definira kao međusobno sljepljivanje trombocita. Sljepljivanje je posljedica otpuštanja ADP-a (iz trombocita ili oštećenih stanica) i njegovog vezivanja na površinske receptore trombocita što dalje dovodi do inhibicije adenilat-ciklaze i smanjene razine cAMP-a u stanicama. Nakon toga slijede konfiguracijske promjene na membrani pri čemu se na membrani prikazuju receptori za fibrinogen. Vezivanjem fibrinogena na receptor dolazi do agregacije trombocita (Kawthalkar 2006.).



Slika 2. Sinteza TAX2 i način djelovanja nekih antitrombocitnih lijekova: **a)** vezanje trombocitnih agonista (ADP, adrenalin) za receptor na površini trombocita i aktivacija membranske fosfolipaze koja otpušta arahidonsku kiselinu iz fosfolipida membrane. **b)** ciklooksigenaza prevodi arahidonsku kiselinu do prostaglandina G2 i H2. **c)** tromboksan sintetaza prevodi prostaglandin G2 i H2 u TAX2 (Prilagođeno prema: Kawthalkar 2006.)

1.2.3. Plazma

Krvna plazma je žućkasta tekućina koja se dobiva nakon centrifugiranja krvi i odvajanja krvnih stanica. Čini je voda u kojoj su otopljene razne anorganske soli i bjelančevine, kao što su albumin i globulin. Plazma, kao i trombociti, ima bitnu ulogu u održavanju hemostaze. Za održavanje hemostaze plazma posjeduje različite plazmatske proteine koji se mogu podijeliti u 3 sustava:

1. Sustav koagulacije: Faktor I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI, XII, XII, prekalikrein, kininogen visoke molekularne mase
2. Fibrinolitički sustav: plazminogen, plazmin, tkivni plazminogeni aktivator (t-PA), α 2-antiplazmin, plazminogeni aktivator 1 i 2
3. Inhibitorni sustav: protein C, protein S, antitrombin-III

Proteini koagulacijskog sustava sudjeluju u reakcijama koagulacije i stvaranja fibrinskih ugrušaka. Prema 'International System of Nomenclature' svi koagulacijski faktori označeni su rimskim brojkama. Većina koagulacijskih faktora se sintetizira u jetri, dok faktor XIII nastaje iz megakariocita. Za razliku od koagulacijskog sustava fibrinolitički sustav je uključen u procese razgradnje ugrušaka i održavanju slobodnog krvotoka. Glavni enzim fibrinolitičkog sustava je plazmin koji nastaje iz plazminogena. Plazmin razgrađuje fibrinogen i umreženi fibrin te pri tome oslobađa fibrinske produkte degradacije koje se potom iz krvotoka uklanjaju pomoću makrofaga. Uz enzimatski fibrinolitički sustav u održavanju protočnosti krvnih žila sudjeluje i sustav inhibitornih koagulacijskih proteina (Kawthalkar 2006.).

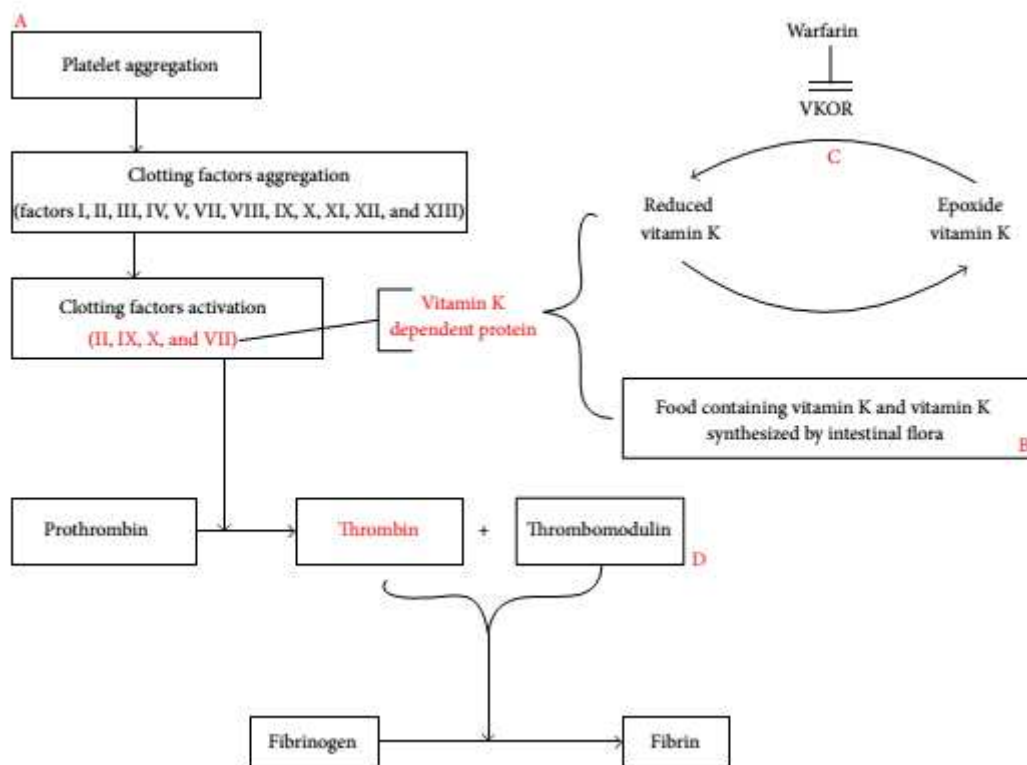
1.3. Antihemostatici

1.3.1. Varfarin

Varfarin je najčešće korišteni oralni antikoagulans od njegovog odobrenja za korištenje 1954. godine. Izrazito je učinkovit u prevenciji i liječenju dubokih venskih tromboza te može poboljšati simptome kod pacijenata sa arterijskom fibrilacijom, umjetnim srčanim zaliscima, sa trajnim centralnim venskim kateterom i kod pacijenata s infarktom miokarda. Bitna značajka varfarina je njegov uski terapijski raspon koji u subterapijskim dozama nema antikoagulatívno djelovanje dok u supratherapijskim dozama izaziva povećani rizik od krvarenja. U kliničkoj upotrebi varfarin se koristi kao racemozna otopina S- i R- enantiomera. S-varfarin je 3-5 puta potentniji antikoagulans od njegovog R-enantiomera. Enantiomerska konfiguracija varfarina utječe na način na koji se varfarin metabolizira. S-varfarin se predominantno metabolizira u S-7 hidroksivarfarin pomoću CYP2C9, dok se R-varfarin djelomično metabolizira u 6- i 8- hidroksivarfarin pomoću CYP1A2, te u 10-hidroksivarfarin pomoću CYP3A4. Smatra se da varfarin svoje glavno antikoagulatívno djelovanje ostvaruje tako da prekida ciklus vitamina K u jetri, koji je bitan u koagulacijskoj kaskadi za normalno funkcioniranje faktora zgrušavanja ovisnih o vitaminu K. Uz ovaj mehanizam varfarin djeluje inhibitorno na plazmatske proteine C i S te na koagulacijske faktore II, VII, IX i X (Ge i sur. 2014., Scott i sur. 2014., Jiang i sur. 2004., Lewis i sur. 1974.). Interferencija biljnih lijekova sa varfarinom značajna je u kliničkim okvirima pa je stoga bitno ustvrditi biljne preparate s kojima varfarin interagira.

Mogući mehanizmi interferencija varfarina i biljnih preparata podijeljeni su u dvije kategorije: interferencije koje uključuju farmakokinetiku varfarina i interferencije koje uključuju farmakodinamiku varfarina. Do promjene u djelovanju varfarina može doći prilikom

interferencija biljnih preparata tijekom apsorpcije varfarina, interferencije biljnih preparata s enzimima koji metaboliziraju varfarin, interferencije s varfarin-vezujućim proteinima, interferencije sa funkcijom trombocita, promjenama u sintezi i ciklusu vitamina K kao i smetnjama u koagulacijskoj kaskadi (Slika 3.) (Ge i sur. 2014.). Do sada je pokazano da na varfarin djeluju različiti biljni preparati, kao što su preparati goji-a (*Lycium barbarum*), češnjaka (*Allium sativum*), ginka (*Ginkgo biloba*) i mnogih drugih. Prema nekim istraživanjima utvrđeno je da sastavnice *Ginkgo biloba* ne povećavaju antikoagulativno djelovanje varfarina kod zdravih ljudi i kod pacijenata sa stabilnim INR. Suprotno tome *In vitro* istraživanje je pokazalo da ekstrakt *Ginkgo bilobe* (EGb 761) inhibira glavne humane citokrom P450 enzime, među kojima i CYP2C9, enzim koji je povezan s metaboliziranjem varfarina. Inhibitorno djelovanje na CYP2C9 može rezultirati povećanom razinom varfarin što dovodi do povećane antikoagulativne aktivnosti (Taki i sur. 2012.).



Slika 3. Shematski prikaz mogućih farmakodinamičkih interakcija između varfarin i biljnih preparata (Preuzeto od: Ge i sur. 2014.)

1.3.2. Acetilsalicilna kiselina

Acetilsalicilna kiselina (Aspirin) je klasični nesteroidni antiinflamatorni lijek s godišnjom proizvodnjom procijenjenom na 100 milijuna tona. Najčešće je upotrebljavani anti-trombocitni lijek u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih oboljenja (Goodman i sur. 2008.). Uneseni aspirin se hidrolizira metabolizmom prvog prolaska pri čemu 50-70% aspirina dopijeva do sistemske cirkulacije. Metabolički obrtaj aspirina limitira njegovu efikasnost, a enzim koji ga hidrolizira još je nepoznat. Postoji nekoliko esteraza, kao što su uridin difosfat glukoronil transferaza i karboksilesteraza 2, koje imaju sposobnost hidrolize aspirina, no i dalje je nepoznat enzim koji doprinosi metaboličkom obrtaju aspirina u krvi (Zhou i sur. 2011.). Svoje glavno djelovanje ostvaruje tako da ireverzibilno inhibira ciklooksigenazu-1 (COX-1) enzim tako da acetilira serinski ostatak na poziciji 529. COX-1 enzim katalizira prijelaz arahidonske kiseline u prostaglandin G_2 i H_2 , koji se dalje pomoću tromboksan sintetaze prevode u, snažan vazokonstriktor i aktivator agregacije trombocita, tromboksan A_2 (TAX2) (Goodman i sur. 2008.). TAX2 je bitan za funkciju trombocita jer trombociti eksprimiraju TAX receptor koji je snažan promotor aktivacije trombocita sa nepotpunim agonistima. Budući da su trombociti anuklearne stanice izrazito su osjetljivi na efekte aspirina jer ne mogu sintetizirati novi enzim koji bi zamijenio inaktivirani COX-1 (Zhou i sur. 2011.). No postoji i niz izvještaja koji predlažu da aspirin svoje djelovanje ostvaruje i preko niza drugih mehanizama neovisnih o inhibiciji COX-1 enzima koji mogu doprinijeti njegovom antiinflamatornom i antitumorskom djelovanju kao i njegovoj citotoksičnosti. Mogući mehanizmi djelovanja aspirina uključuju stvaranje reaktivnih kisikovih radikala, mitohondrijska disfunkcija i indukcija apoptoze. Nedavno istraživanje na tumorskim HepG2 stanicama je pokazalo da tretman s aspirinom, u određenoj dozi i vremenu, dovodi do zaustavljanja staničnog ciklusa HepG2 stanica, redukcije u mitohondrijskom potencijalu i promjene u redoks i respiratornoj funkciji mitohondrija te povećane produkcije ROS. Suprotno tome aspirin je pokazao i antioksidativno djelovanje na endotelnim stanicama preko puta NO/cGMP (Raza i sur. 2012.). Wu i sur. (2012.) su u svome istraživanju također predočili rezultate koji dokazuju antioksidativno djelovanje aspirina. Prema njihovom istraživanju aspirin svoje antioksidativno djelovanje ostvaruje smanjenjem aktivnosti i ekspresije NAD(P)H oksidaze i smanjenjem produkcije kardiovaskularnog superoksidnog aniona (O_2^-).

1.4. Dodaci prehrani

1.4.1. *Ginkgo biloba*

Ginkgo biloba je jedini danas živi član iz biljaka divizije Ginkgophyta. Fosilni nalazi pokazuju da se ova biljka prvi puta javlja u Permian-u prije 250 milijuna godina. Dugi niz godina ova biljka se kultivira i uzgaja u hramovima i samostanima diljem Japana i Kine (Glimn-Lacy 2006.), gdje se koristila kao lijek u tradicionalnoj azijskoj medicini. Danas je *Ginkgo biloba* četvrti po redu najzastupljeniji biljni lijek u SAD-u, sa ukupno 4,3% od svih kupljenih biljnih pripravaka u 2001.g.. Ginkgo se u današnje vrijeme najčešće koristi u liječenju demencije no koristi se i za poboljšanje memorije, u liječenju cerebrovaskularne i arterijske insuficijencije, tinitusa, vertiga, astme, alergija i mnogih drugih zdravstvenih poremećaja. Iako precizni mehanizam djelovanja još nije u potpunosti razriješen, vjeruje se da ginkgo poboljšava cerebralni i periferni krvotok preko NO-inducirane vazodilatacije, a uz tu osobinu posjeduje i antioksidativna svojstva koja sprječavaju stanična oštećenja, također posjeduje inhibični učinak na trombocit aktivirajući faktor (Bent i sur. 2005.). Ekstrakt *Ginkgo biloba* (EGb 761) je kompleksna mješavina različitih sastavnica od kojih 25% čine flavonoidi kao što su kampferol, kvercetin, izoramnetin i proantocijanidi, uz njih nalazimo i heterozide terpena (ginkgolidi, bilobalidi) te neke organske kiseline (Ebadi 2002.). Ekstrakt *Ginkgo biloba* (EGb 761) štiti stanice hipokampusa od toksičnosti inducirane dušičnim oksidom (NO). NO je glasnička molekula u neuronima čija prekomjerna proizvodnja može dovesti do pojave neurotoksičnosti. Proizvodnja superoksidnih aniona je jedan od glavnih faktora uključenih u NO toksičnost, zbog njegovog međudjelovanja s NO i stvaranja izrazito toksičnog slobodnog radikala peroksinitrita. Ključna značajka superoksidnog aniona u NO-povezanim inzultima je pokazana rezultatima istraživanja u kojem su transgenični miševi s prekomjernom ekspresijom SOD-a otporni na moždanu ishemiju. Stoga hvatanje superoksidnog aniona od strane EGb 761 djelomično može razjasniti njegovu sposobnost sprječavanja stanične smrti i smanjenje porasta akumulacije reaktivnih kisikovih radikala. EGb 761 bi također mogao i direktno hvatati peroksinitrite i time inhibirati lipidnu peroksidaciju, što se može razjasniti njegovom sposobnošću da blokira citotoksičnost induciranu peroksinitritom kao i njegovom inhibičnom djelovanju na peroksidaciju induciranu ciklosporinom-A (Ebadi 2002.). Također se smatra da je jedno od neuroprotektivnih djelovanja *Ginkga bilobe* povezano sa inhibičnim djelovanjem EGb 761 na monoamin oksidaze (MAO) koje kataliziraju oksidaciju monoamina u mitohondrijima stanica

mozga (Ebadi 2002.). Suprotno tome Fowler i sur. (2000.) su pokazali da primjena EGb 761 nije dovela do značajnijih promjena u aktivnosti MAO A i MAO B u mozgu što ukazuje na to da je drugi mehanizam odgovoran za neuroprotektivno djelovanje *Ginkga bilobe*, a ne inhibicija MAO. Također je utvrđeno da EGb 761 znatno inhibira glavne ljudske citokrom P450 enzime CYP2C9, CYP1A2, CYP2E1 i CYP3A4, te da kompetitivno inhibira metabolizam oralnog antidijabetskog agenta tolbutamida preko enzima (S)-varfarin-7-hidroksilaze u mikrosomima jetre štakora. Suprotno tome jedno istraživanje je pokazalo da unos 100mg EGb 761 na dan kroz period od 4 tjedna nije imalo značajnijeg utjecaja na PT INR razinu u pacijenata liječenih sa varfarinom. Stoga je moguće da je sklonost krvarenju povezana s učincima EGb 761, posljedica njegovog djelovanja na agregaciju trombocita, a ne na metabolizam varfarina (Samuels N. 2005.). Cho i Nam (2007.) su u svome istraživanju utvrdili da *Ginkgo biloba* djeluje inhibitorno na agregaciju trombocita preko ginkgolida B (GB). Utvrdili su da različite koncentracije GB značajno smanjuju agregaciju trombocita stimuliranu kolagenom, uz to djelovanje potiču aktivaciju metaloproteinaze-9 (MMP-9) koja inhibira agregaciju trombocita stimuliranu kolagenom. Također su utvrdili da GB direktno djeluje na aktivnost adenilat ciklaza i cAMP-ovisne fosfodiesteraze (PDE) kao i gvanilat ciklaza i cGMP ovisne PDE. Povećana razina cAMP i cGMP posredno dovode do aktivacije enzima protein kinaze A i protein kinaze G koji fosforiliraju svoje ciljne proteine što dovodi do negativne regulacije agregacije trombocita. Suprotno tome postoje i dokazi koji upućuju na to da *Ginkgo biloba* nema učinka na ADP ili kolagenom induciranu agregaciju trombocita u štakoru *in vitro* (Jiang i sur. 2004.).

1.4.2. Vulkan

Vulkan je dodatak prehrani namijenjen poboljšanju potencije kod muškaraca. Prema navodim proizvođača u svom sastavu sadrži isključivo biljne ekstrakte: *Ginkgo biloba*, matičnjaka (*Melissa officinalis*), hmelja (*Humulus lupulus*) i origana (*Origanum vulgare*). Matičnjak je pokazao niz neuroprotektivnih učinaka (Bayat i sur. 2012.), dok su origano i hmelj pokazali dobre antioksidativne sposobnosti. Tako je 4-fenil-O-β-D-glukopiranozid iz *Origanum vulgare* pokazao inhibitorni učinak na lipidnu peroksidaciju te povećanu aktivaciju glutacion peroksidaze (Liang i sur. 2012.). Suprotno od origana i njegovog direktnog antioksidativnog učinka, hmelj je pokazao modulatorne sposobnosti na antioksidativni sustav trombocita. Prema rezultatima Olas i sur. (2012.) ekstrakt hmelja je u *in vitro* uvjetima pokazao

protektivni efekt na djelovanje peroksinitrita, kao što su oksidativna oštećenja u trombocitnim proteinima i lipidima.

1.4.3. Gotu kola (*Centella asiatica*)

Centella asiatica poznata pod sinonimom 'Gotu kola' je tropska biljka iz područja jugoistočne Azije iz obitelji Apiaceae koja je svoju primjenu našla u tradicionalnoj azijskoj medicini. Utvrđeno je da ima niz bioloških poželjnih utjecaja na zdravlje čovjeka kao što su: zacjeljivanje rana, antiinflamatorno djelovanje, hepatoprotektivno, antikonvulzivno, imunostimulativno, kardioprotektivno, antidijabetsko, antiviralno, antioksidativno, antitumorsko, antimikrobno i niz drugih djelovanja. U svojoj kemijskoj građi sadrži niz različitih kemijski skupina. Glavne kemijske skupine u *Centella asiatica* su triterpenski saponini, od kojih su najbitniji azijatska kiselina, madekasična kiselina, madazijatska kiselina, betulirična kiselina i druge. U svom sastavu sadrži i neke flavonoide kao što su kvercetin, kamferol, rutin, patuletin i drugi (Orhan 2012.). Pretpostavlja se da je neuroprotektivna sposobnost ove biljke povezana s različitim mehanizmima od kojih se najviše spominje pozitivno antioksidativno djelovanje povezano sa sastavom triterpenski derivata. Pakdeechote i sur. (2014.) su svome istraživanju na štakorima s metaboličkim sindromom pokazali antioksidativno djelovanje triterpenski derivata *Centella asiatica*. U istraživanju su štakori s metaboličkim sindromom tretirani sa azijatskom kiselinom 10-20 mg/ kg kroz period od 3 tjedna. Nakon uzimanja uzoraka utvrđeno je da je došlo do smanjene ekspresije endotelne NO-sintetaze i smanjenja markera oksidativnog stresa u plazmi štakora. Zhao i sur (2014.) su također dokazali antioksidativno djelovanje ekstrakta *Centella asiatica in vitro*. Nakon 35 dnevne primjene ekstrakta *Centella asiatica* došlo je do povećanja razine SOD i GPx u jetri te je došlo do smanjenja razine MDA, biomarkera lipidne peroksidacije.

1.4.4. Borovnica (*Vaccinium myrtillus*)

Borovnica (*Vaccinium myrtillus*) se sa 1210 mg/ 100g svježeg voća smatra dobrim izvorom antocijana. Antocijani su polifenolne komponente borovnice odgovorne za plavkastu boju i visoki antioksidativni učinak borovnice. Neko vrijeme se smatralo da antocijani svoj bioaktivni učinak ostvaruju direktnim hvatanje reaktivnih kisikovih radikala, no niska biodostupnost od 1,7% do 3,3 % sugerira da svoj bioaktivni učinak ostvaruju promjenom redoks regulacije, a ne direktno hvatanjem reaktivnih kisikovih vrsta (Chu i sur. 2011., Bornsek i sur 2012.). Dokazano je da antocijani i ostale polifenolne komponente borovnice

dovode do povećane razine antioksidativnih enzima hemoksigenaze-1 (HO-1) i glutation-S-transferaze u pigmentnim stanicama retine. Što sugerira da antocijani stimuliraju signalnu transdukciju staničnih puteva koji djeluju na gene odgovorne za antioksidativni odgovor stanice (Milbury i sur. 2007.). Prema rezultatima Jakešević i sur. (2011.), svakodnevna primjena borovnice na miševima kroz period od 10 dana pokazala je antioksidativni učinak te znatno smanjenja razine MDA. Svi ti faktori potvrđuju antioksidativan učinak borovnice i njenih polifenolnih komponenti, a prije svega antocijana.

1.5. Cilj istraživanja

U ovome istraživanju provest će se standardno toksikološko testiranje. Pokus će se provoditi varfarinom i salicilnom kiselinom zasebno ili u kombinaciji s 3 različita biljna pripravka na štakorima Y 59, prema OECD protokolu 407 (subkronična 28 dnevna toksičnost) izloženih preporučenim RfD dozama prijavljenim na deklaraciji proizvoda (korigiranog s obzirom na težinu životinja i metabolizam toksikološkog modela). Pokušat će se utvrditi da li ijedan od ispitivanih proizvoda može uzrokovati toksične fiziološke promjene te promjenu u antioksidativnom statusu krvi. Cilj ovoga istraživanja je proučiti učinke antihemostatskih lijekova u kombinaciji s vazodilatacijskim suplementima na krv, te postoji li korelacija između količine bioaktivnih tvari i eventualnih promjena u toksikološkom i antioksidativnom statusu krvi.

2. Materijali i metode

2.1. Tretiranje životinja

Istraživanje je provedeno na ukupno 50 muških štakora Y59, podjeljenih u 9 skupina sa po 5 životinja s obzirom na tretman s pojedinim preparatom, te kontrolna skupina koja je primala fiziološku otopinu (Tablica 1.). Životinje su jednom dnevno bile izložene RfD dozama (mg/kg) prema specifikacijama proizvođača (korigiranim s obzirom na težinu životinja i metabolizam toksikološkog modela) kroz period od 28 dana, prema standardnom toksikološkom OECD protokolu 407 (subkronična 28 dnevna toksičnost).

2.2. Izolacija i priprema tkiva

Nakon 28 dana životinje smo anestetizirali mješavinom Xylapana i Narketana (i.p. 25 mg/kg). Potom smo u epruvetu s 3,8% Na-citratom iz abdominalne aorte prikupili krv. Uzorak smo potom razdijelili u dva dijela. Jedan dio uzorka smo centrifugirali na 3500 okretaja kroz 10 min kako bi dobili trombocitima siromašnu plazmu PPP (platelet poor plasma), a drugi dio smo centrifugirali na 1500 okretaja kroz 10 min kako bi dobili trombocitima bogatu plazmu PRP (platelet rich plasma). Nakon što smo iz iscentrifugiranog uzorka izdvojili PPP epruvetu sa koncentriranim eritrocitima RBC (red blood cells), preostalim nakon centrifugiranja, smo zajedno s PPP i PRP uzorcima zamrznuli na -80°C . Nakon mjesec dana uzorke smo pripremili za analizu i analizirali ih. PRP uzorak je prvo homogeniziran na ultrazvučnom homogenizatoru nakon čega smo uzorak centrifugirali na 15000 okretaja kroz 15 min na 4°C . Nakon centrifugiranja smo odvojili supernatant i koristili ga za analizu. Za RBC uzorak smo prvo odvagali 100mg u eppendorf tubice nakon čega smo dodali 900 μL fosfatnog pufera. Potom smo uzorak homogenizirali na ultrazvučnom homogenizatoru nakon čega smo isti centrifugirali na 15000 okretaja kroz 15 min na 4°C . Nakon centrifugiranja smo odvojili supernatant i koristili ga za analizu, dok za PPP uzorak nije bila potrebna dodatna priprema.

Tablica 1. Pokusne skupine i doziranje preparata

Oznaka skupine	Sastav pokusne otopine	Doziranje
0.KONTROLA	Fiziološka otopina	2 mL svaki dan
1.GINKO	Komercijalni pripravak <i>Ginkga biloba</i> (GINKOCEL Dietpharm)- 400 mg preparata sadrži 120 mg Ginkga	5,71 mg preparata/kg svaki dan
2.VULKAN	Komercijalni pripravak mješavine različitih biljaka: hmelj, matičnjak, ekstrakt origana i <i>Ginkgo biloba</i> (VULKAN Avala pharma)- 1650 mg preparata sadrži 150 mg Ginkga	23,5 mg preparata/kg svaki dan
3.SALICILNA	Otopina 0,86 mg acetil-salicilne kiseline na 1 mL vode	4,2 mg/kg svaki dan
4.VARFARIN	Otopina varfarina	Kroz 12 dana fiziološka otopina, a zadnja 3 dana varfarin u dozi 0,4 mg/mL
5.VULKAN+VARFARIN	Kombinacija otopina skupina 2. Vulkan i 4. varfarin	Kroz 12 dana otopina 2.Vulkan, nakon 13. dana u tretiranje je uključena i otopina 4.Varfarin
6.VULKAN+SALICILNA	Kombinacija otopina skupina 2. Vulkan i 3. Salicilna kiselina	Kroz 12 dana otopina 2.Vulkan, nakon 13. dana u tretiranje je uključena i otopina 3. Salicilna kiselina
7.GINKO+VARFARIN	Kombinacija otopina skupina 1. Ginko i 4.Varfarin	Kroz 12 dana otopina 1. Ginko, nakon 13. dana u tretiranje je uključena i otopina 4. Varfarin
8.GINKO+SALICILNA	Kombinacija otopina skupina 1. Ginko i 3. Salicilna kiselina	Kroz 12 dana otopina 1. Ginko, nakon 13. dana u tretiranje uključena i otopina 3. Salicilna kiselina
9.GINKALERT	Komercijalni pripravak <i>Ginkgo biloba</i> i mješavine biljnih pripravaka: Gota Kola (<i>Centella asiatica</i>) sa 10% triterpena i Borovnica sa 36% antocijanozida (GINKALERT Solaray) – 720 mg preparata sadrži 120 mg Ginka	10,2 mg preparata/kg

2.3. Određivanje proteina metodom po Lowry-u

Količina proteina u tkivima određena je metodom po Lowryju (1951.). Ova metoda kombinira biuretsku reakciju te oksidaciju aromatskih bočnih ogranaka. Biuretska reakcija temelji se na redukciji bakra u reakciji s peptidnom vezom u lužnatim uvjetima. Mehanizam reakcije u kojoj dolazi do oksidacije aromatskih bočnih ogranaka je nepoznat, ali pri tome se reducira fenolni reagens.

Metodom po Lowryju određeni su proteini u PPP i PRP uzorcima štakora. Uzorci su razrijeđeni 100 puta u PBS-u. U epruvete je dodano po 100 μ L razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D (Tablica 2.) i inkubirano je 10 min na sobnoj temperaturi. Sve je rađeno u duplikatima. Nakon toga dodano je 200 μ L otopine E (Tablica 2.) nakon čega se snažno vorteksira i inkubira 30 min na sobnoj temperaturi. Količina proteina određena je na spektrofotometru mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini od 600 nm. Kao standard upotrijebljen je albumin goveđeg seruma (eng. *Bovine serum albumin*, BSA) u koncentracijama od 6 mg/mL prema manjim koncentracijama (6; 3; 1,5; 1, 0,6, 0,3, 0,15, 0,1 i 0 mg/mL). Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentracije BSA određen je nagib pravca. Preko nagiba pravca izračunata je koncentracije proteina u uzorcima prema sljedećoj formuli: $C = \frac{A(\text{uzorka}) - b(\text{st.krivulje})}{\text{nagib pravca st.krivulje}} \times \text{razrijeđenje}$. Koncentracija proteina izražena je kao mg/mL.

2.4. Mjerenje hemoglobina u eritrocitima

Količina hemoglobina u eritrocitima (RBC) određivana je pomoću metode s cijanidnim reagensom. Reakcija se temelji na litičkom djelovanju cijanidnog reagensa koji oslobađa hemoglobin iz eritrocita, nakon čega dolazi do oksidacije hemoglobina s cijanidom te se stvara stabilan obojeni kompleks cijanmethemoglobin.

Koncentracija ukupnog hemoglobina u RBC mjeri se na spektrofotometru na valnoj duljini od 560 nm. U epruvetu se dodaje 20 μ L uzorak RBC i 5 mL radne otopine cijanidnog reagensa pripremljene prema (Tablica 2.). Nakon dodavanja cijanidnog reagensa uzorak se inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega isti iscentrifugiramo na 2700 okretaja kroz 10 minuta. U drugu epruvetu se nalije 5 mL standarda s poznatom koncentracijom hemoglobina od 150 g/L. Nakon centrifugiranja mjere se vrijednosti apsorbancije uzorka i standarda.

Koncentraciju hemoglobina u uzorku izračunavamo prema formuli:

$$y(\text{hemoglobina u uzorku}) = \frac{A(\text{uzorka})}{A(\text{standarda})} \times y(\text{hemoglobina u standardu}), \text{ te se izražava}$$

kao g/L.

2.5. Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

Koncentracija ukupnog glutationa u PPP, PRP i RBC štakora određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969.). Metoda se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) koja se može fotometrijski očitati na 412 nm. Osim TNB, stvara se i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Brzina nastanak TNB proporcionalna je recirkulirajućoj reakciji koja je proporcionalna koncentraciji glutationa u uzorku. Pri ovoj metodi sav oksidirani GSH (disulfid GSSG) prisutan u reakcijskoj smjesi ili nastao iz miješanog disulfida GSH s GS-TNB brzo se reducira do GSH. Konačan rezultat koji se dobije odgovara ukupnoj koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku.

Koncentracija ukupnog GSH mjeri se u mikrotitarskoj pločici. U jednu jažicu dodaje se 20 μL uzorka, 40 μL 0,035 M HCl i 40 μL 10 mM DTNB te se mjeri apsorbancija na valnoj duljini od 415 nm. Zatim se dodaje 100 μL otopine glutation reduktaze i NADPH te se mjeri apsorbancija tijekom 5 min. Priprema navedenih otopina prikazana je u Tablica 2.. Kao slijepa proba korišten je PBS u reakcijskoj smjesi. Za standard korištene su koncentracije reduciranog GSH (5-100 μM). Nacrtani su pravci za sve standarde kao promjena apsorbancije u vremenu. Očitani su nagibi pravaca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema sljedećoj formuli :

$$C = \frac{\text{nagib pravca uzorak} - \text{nagib pravca slijepa proba}}{\text{nagib pravca standarda}} \times \text{razrijeđenje}.$$

Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao μM GSH po mL proteina za PPP i PRP uzorak, odnosno kao μM GSH po mg hemoglobina za RBC uzorak.

2.6. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD određena je prema metodi po Flohé i Ötting (1971.). Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

U ovoj metodi korištene su dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 2.) te je apsorbancija u spektrofotometru mjerena na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze. U eppendorf-epruvetu je stavljeno 1,45 mL otopine A, 25 μ L dH₂O i 15-30 μ L ksantin oksidaze (0,8 U/mL) (Tablica 2.). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja reakcijska smjesa prelivena je u kivetu i mjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti oko 0,025 U/min. U ovom slučaju volumen XOD koji je odgovarao bio je 25 μ L. Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, analizirani su uzorci. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH₂O dodano je 25 μ L uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Enzimska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze koja se računa prema formuli:

$$\%inhibicije = 100 - \frac{\Delta A(\text{uzorka})}{\Delta(\text{slijepa proba})} \times 100.$$

Enzimatska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) računa se prema formuli:

$$\text{Aktivnost SOD} = 10 \exp^{((\% inhibicije + 12,757)/30,932)}.$$

Aktivnost SOD izražena je kao U/mg hemoglobina za RBC, odnosno kao U/mg proteina za PPP i PRP.

2.7. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze određena je spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984.). U toj metodi aktivnost katalaze određuje se kao količina potrošenog H₂O₂. U reakcijsku smjesu u kivetu ukupnog volumena 1 mL dodano je 985 μ L 10 mM H₂O₂ za PPP uzorak, a za PRP i RBC 995 μ L 10 mM H₂O₂, a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je nerazrijeđeni uzorak. Nakon toga je na spektrofotometru mjereno smanjenje količine H₂O₂ pri 240 nm tijekom jedne minute. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) prema formuli: $C = \frac{A(\text{uzorka})}{\epsilon(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot l} \times \text{razrijeđenje}$, gdje je l jednak putu koji zraka svjetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm. Rezultat je izražen kao U/mg proteina za PPP i

PRP, odnosno U/mg hemoglobina za RBC, što odgovara μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina, odnosno po miligramu hemoglobina.

2.8. Mjerenje količine lipidne peroksidacije

Količina lipidne peroksidacije u RBC određivana je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (2007.). U metodi se mjeri koncentracija malondialdehida (MDA), jednog od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Temelji se na reakciji MDA s tiobarbiturnom kiselinom i pri čemu se stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.

U eppendorf-epruvetu je dodano $100 \mu\text{L}$ 8,1%-tni SDS, $750 \mu\text{L}$ 20%-tne octene kiseline (pH=3,5), $750 \mu\text{L}$ 0,8%-tne TBA (pripremljeni prema: Tablica 2) i $100 \mu\text{L}$ homogenog uzorka. Otopina je zatim stavljena u vodenu kupelj na $100 \text{ }^\circ\text{C}$ na 60 minuta. Nakon toga je naglo ohlađena na ledu i zatim centrifugirana 15 min na 5000 rpm pri $4\text{--}6 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant je odvojen i izmjerena je apsorbancija pri 532 nm. Ukupna koncentracija MDA izračunata je prema sljedećoj formuli:
$$C = \frac{A(\text{uzorka}) \times V(\text{reakcijske smjese})}{\epsilon \times V(\text{uzorka}) \times C(\text{hemoglobina uzorka})}$$
 te je izražena kao nmol MDA po mg hemoglobina.

2.9. Statistička obrada

Za statističku obradu podataka korišten je računalni program "Statistica". Pomoću računalnog programa proveli smo analizu varijance (ANOVA). Pomoću podatak dobivenih iz analize varijance dobili smo uvid o podudarnosti i razlikama između pokusnih skupina, razlike između skupina potvrđene su LSD post hoc testom. Dalje smo pomoću istoga programa došli do vrijednosti medijana i standardne devijacije pokusnih životinja u skupini. Dobivene podatke smo koristili u daljnjoj analizi podudarnosti i razlika između pojedinih varijabli koje smo mjerili u ovome istraživanju.

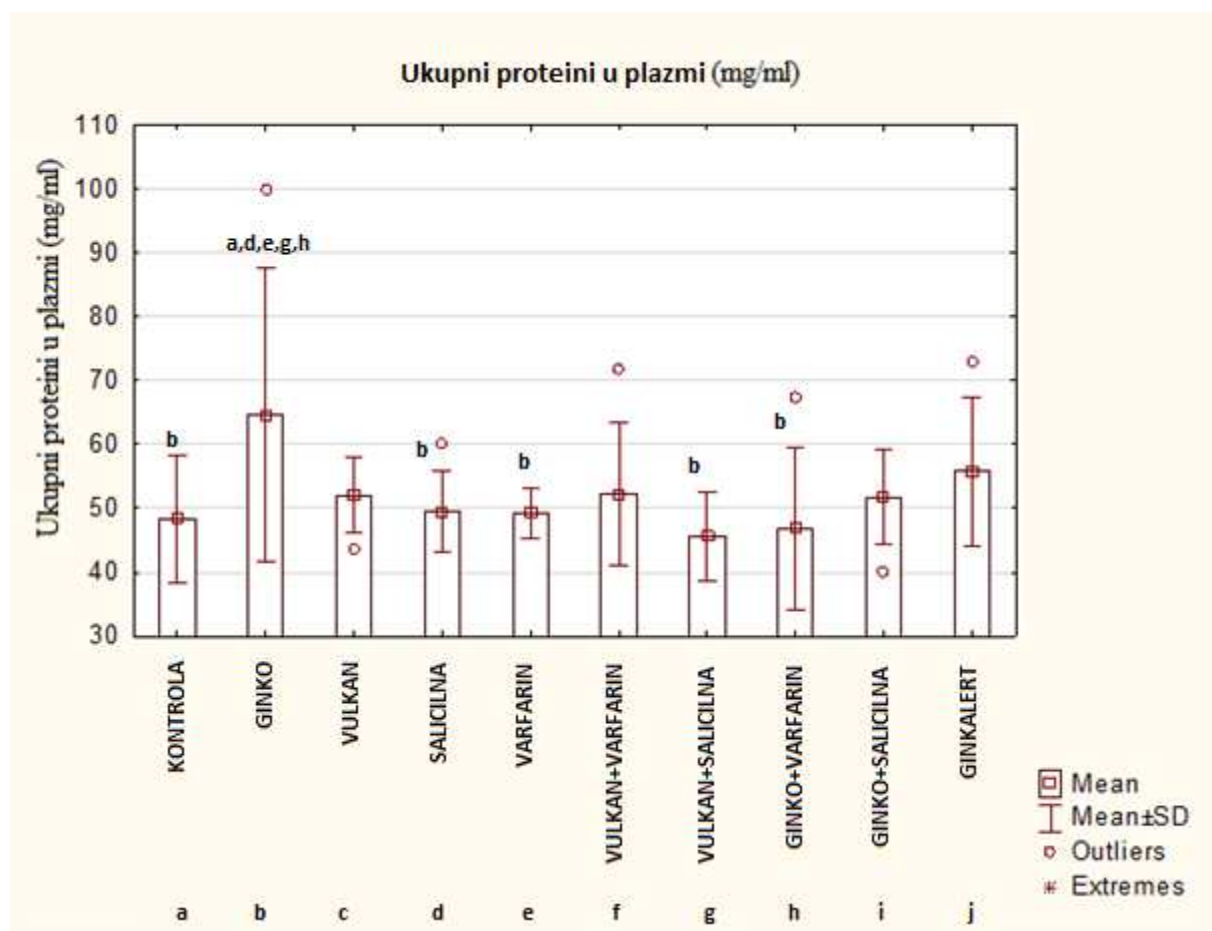
Tablica 2. Priprema pokusnih otopina

Otopina	Priprema otopine
Otopina D (određivanje proteina prema Lowryu)	Pomiješati otopine u omjeru A:B:C=48:1:1 A: 2% (w/v) Na ₂ CO ₃ u 0,1 mM NaOH B: 1% (w/v) natrij-kalij tartarat u dH ₂ O C: 0,5% (w/v) CuSO ₄ × 5 H ₂ O u dH ₂ O
Otopina E (određivanje proteina prema Lowryu)	Pomiješati Folin & Ciocalteu's phenol reagent i dH ₂ O u omjeru 2:1
Radna otopina cijanidnog reagensa (određivanje Hemoglobina)	Pomiješati 20 ml cijanidnog reagensa, iz kita za određivanje hemoglobina, sa 980 mL dH ₂ O
0,81% TBA (određivanje MDA)	Otopiti 0,8 g TBA u 40 mL dH ₂ O uz lagano zagrijavanje. Dodati 500 µL 5M NaOH te nadopuniti s dH ₂ O do 100 mL.
Reagens A (određivanje MDA)	Pomiješati 100 µL 8,1% SDS sa 750 µL 20% octene kiseline namještene na pH=3,5 i 750 µL 0,81% TBA
0,5 M pufer PBS (određivanje GSH)	Pomiješati 17 mL 1 M Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O (otopiti 3 g Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O u dH ₂ O i nadoliti dH ₂ O do 17 mL) i 183 mL 1 M Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O (otopiti 65,5 g Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O u dH ₂ O i nadoliti dH ₂ O do 183 mL)
0,5 M EDTA (određivanje GSH)	Otopiti 37,2 g EDTA u dH ₂ O i nadoliti dH ₂ O do 200 mL
0,5 M pufer PBS s 0,25 M EDTA (određivanje GSH)	Pomiješati 200 mL 0,5 M pufer PBS i 200 mL 0,5 M EDTA
0,035 M HCl (određivanje GSH)	Pomiješati 7 mL 0,1 HCl s 193 mL dH ₂ O
Ellmanov reagens (određivanje GSH)	Otopiti 20 mg DTNB u 5 mL 0,5 M pufer PBS s 0,25 M EDTA
0,8 mM NADPH (određivanje GSH)	Otopiti 6,67 mg NADPH s 10 mL 0,5M pufer PBS s 0,25 M EDTA
50 mM PBS (određivanje SOD)	Pomiješati 17 mL (otopiti 1,56 g NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O u 50 mL dH ₂ O) i 183 mL (otopiti 5,678 g Na ₂ HPO ₄ u 200 mL dH ₂ O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL s d H ₂ O
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA (određivanje SOD)	Otopiti 3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A (određivanje SOD)	Pomiješati 190 mL 0,05 mM citokroma c (otopiti 29 mg citokroma c u 190 mL 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA) i 19 mL 1 mM ksantina (uz lagano zagrijavanje otopiti 3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH)
Otopina B enzima ksantin oksidaze (aktivnost 0,8 U/mL) (određivanje SOD)	Pomiješati 40 µL ksantin oksidaze i 960 µL dH ₂ O

3. Rezultati

3.1. Ukupni proteini u plazmi

Mjerenja ukupnih proteina u plazmi su pokazali da je u grupi 1. Ginko (58,823 mg/mL) došlo do povećanja koncentracije ukupnih proteina u plazmi (Slika 4.) (Tablica 3.).



Slika 4. Prikaz ukupnih proteina u plazmi u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.

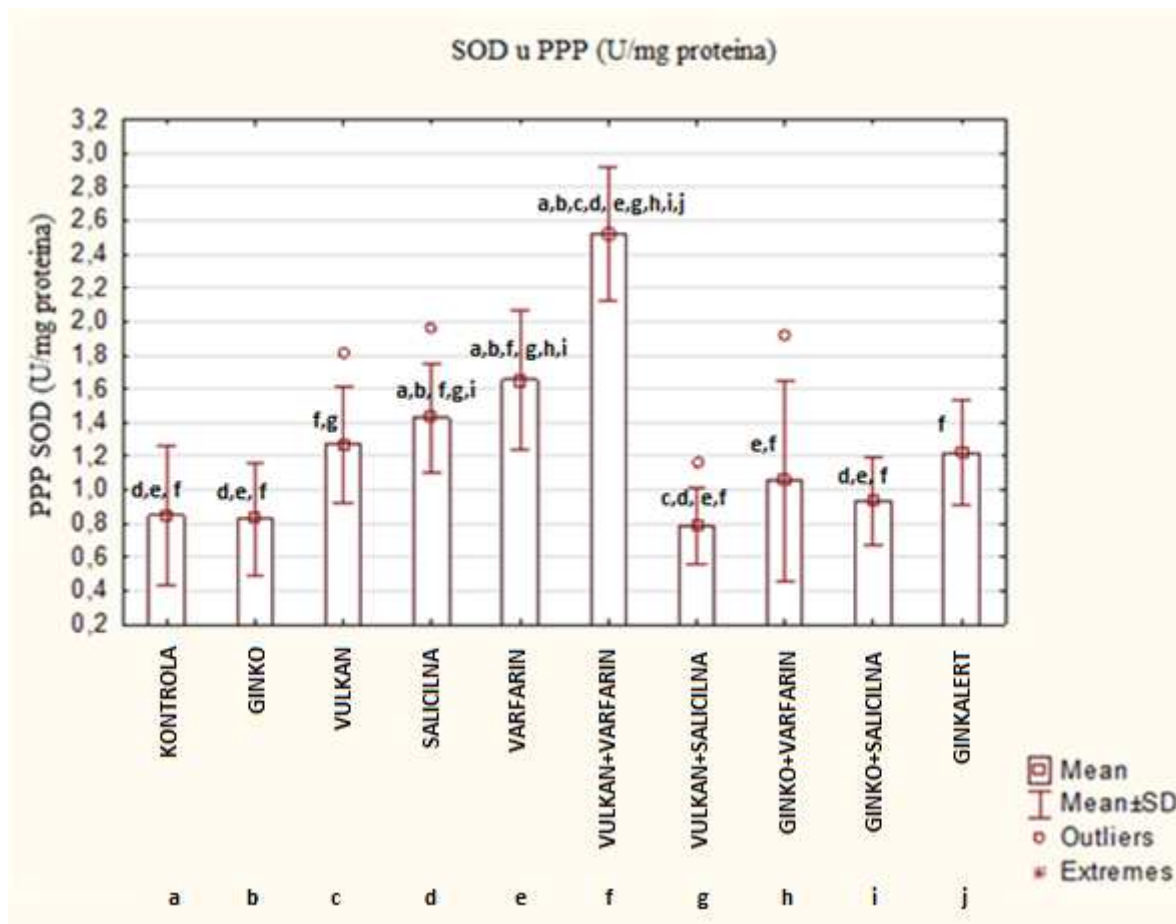
Tablica 3. Ukupni proteini u plazmi

Vrijednosti medijana, min. i max. za ukupne proteine u plazmi			
Oznaka skupine	Plazma (mg/mL)		
	Medijan	Min.	Max.
0.Kontrola	47,722	37,950	59,962
1.Ginko	58,823	43,643	99,810
2.Vulkan	52,561	43,643	57,685
3.Salicilna	47,058	43,833	60,151
4.Varfarin	48,292	45,730	54,459
5.Vulkan+Varfarin	47,817	44,592	71,916
6.Vulkan+Salicilna	49,335	36,622	51,233
7.Ginko+Varfarin	44,781	32,447	67,362
8.Ginko+ Salicilna	55,218	40,037	58,254
9.Ginkalert	54,838	43,263	72,865

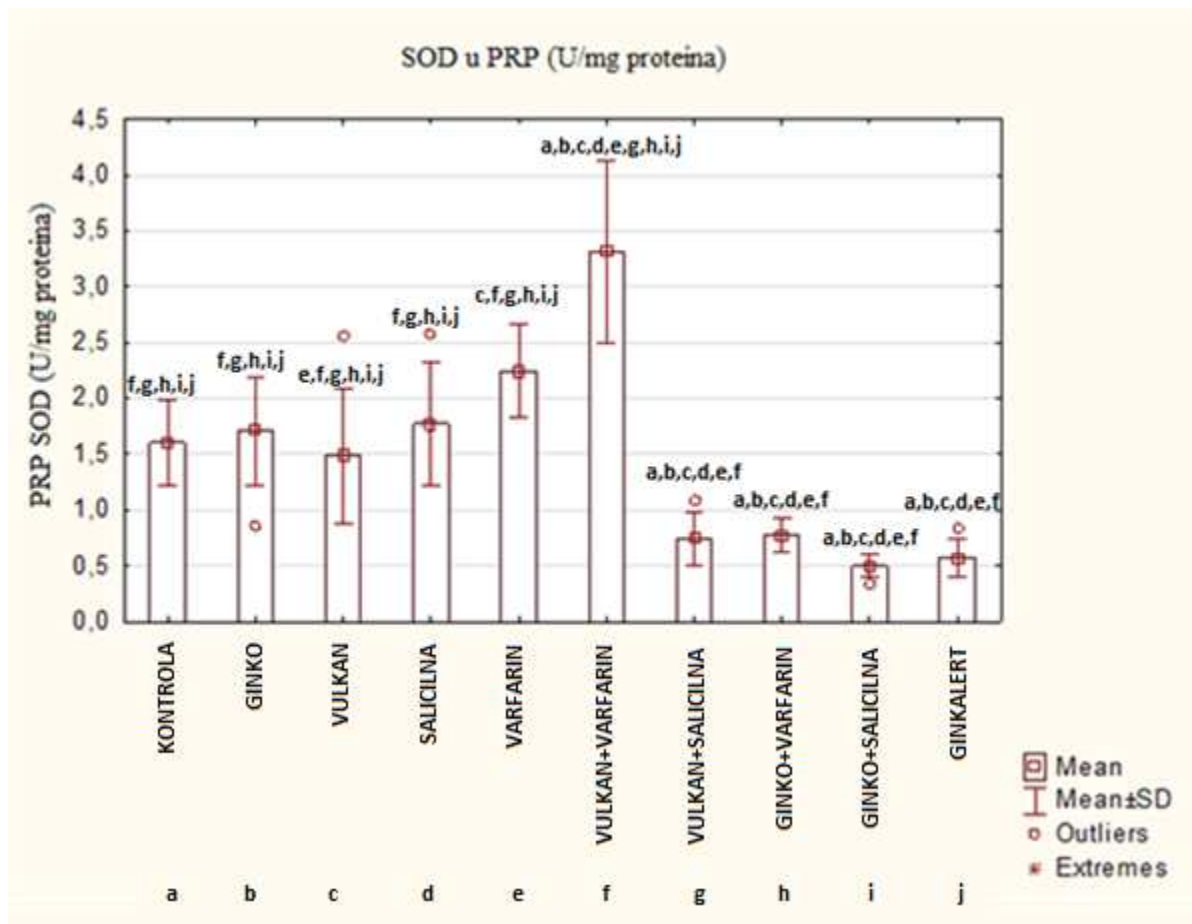
3.2. Aktivnost SOD-a u uzorcima

Vrijednosti SOD za uzorke PPP su pokazale značajne razlike u aktivnosti SOD-a. Skupina 5.vulkan+varfarin pokazala je znatno veću aktivnost SOD-a (1,062 U/mg proteina) u odnosu na sve skupine. Skupne 3. Salicilna (1,361 U/mg proteina) i 4. Varfarin (1,465 U/mg proteina) pokazale su veću aktivnost SOD-a u odnosu na skupine: 0. Kontrola, 1. Ginko, 6. Vulkan+salicilna, 7. Ginko+varfarin i 8.Ginko+salicilna (Slika 5.).

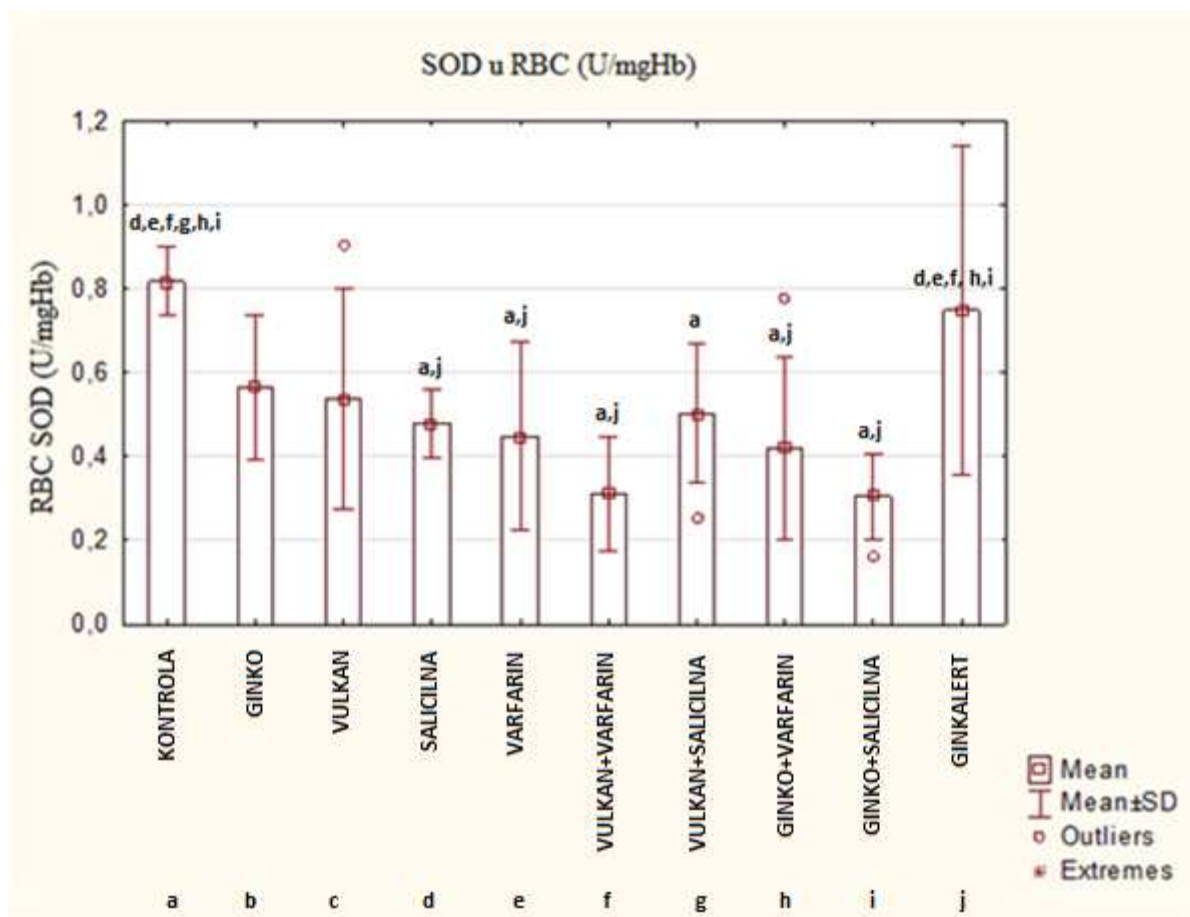
SOD je pokazao različite aktivnosti u uzorcima PRP. SOD je pokazao nižu aktivnost u skupinama 6. Vulkan+salicilna (0,666 U/mg proteina), 7. Ginko+varfarin (0,782 U/mg proteina), 8. Ginko+salicilna (0,519 U/mg proteina) i 9. Ginkalert (0,572 U/mg proteina) u odnosu na 0. Kontrola koja je imala aktivnosti 1,606 U/mg proteina. U odnosu na skupinu 2. Vulkan skupine 5. Vulkan+varfarin i 6.Vulkan+salicilna pokazale su nižu aktivnost SOD-a. U odnosu na skupinu 1.Ginko skupine 7. Ginko+varfarin i 8. Ginko+salicilna su pokazale nižu aktivnost SOD-a (Slika 6.). U RBC uzorcima SOD je pokazao povećanu aktivnosti u skupinama 0. Kontrola (0,836 U/mg Hb) i 9. Ginkalert (0,591 U/mg Hb) u odnosu na skupine 3. Salicilna (0,444 U/mg Hb), 4. Varfarin (0,427 U/mg Hb), 5. Vulkan+varfarin (0,253 U/mg Hb), 7. Ginko+varfarin (0,403 U/mg Hb), 8. Ginko+salicilna (0,322 U/mg Hb) (Slika 7.) (Tablica 4.).



Slika 5. Prikaz aktivnosti SOD-a u PPP u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.



Slika 6. Prikaz aktivnosti SOD-a u PRP u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.



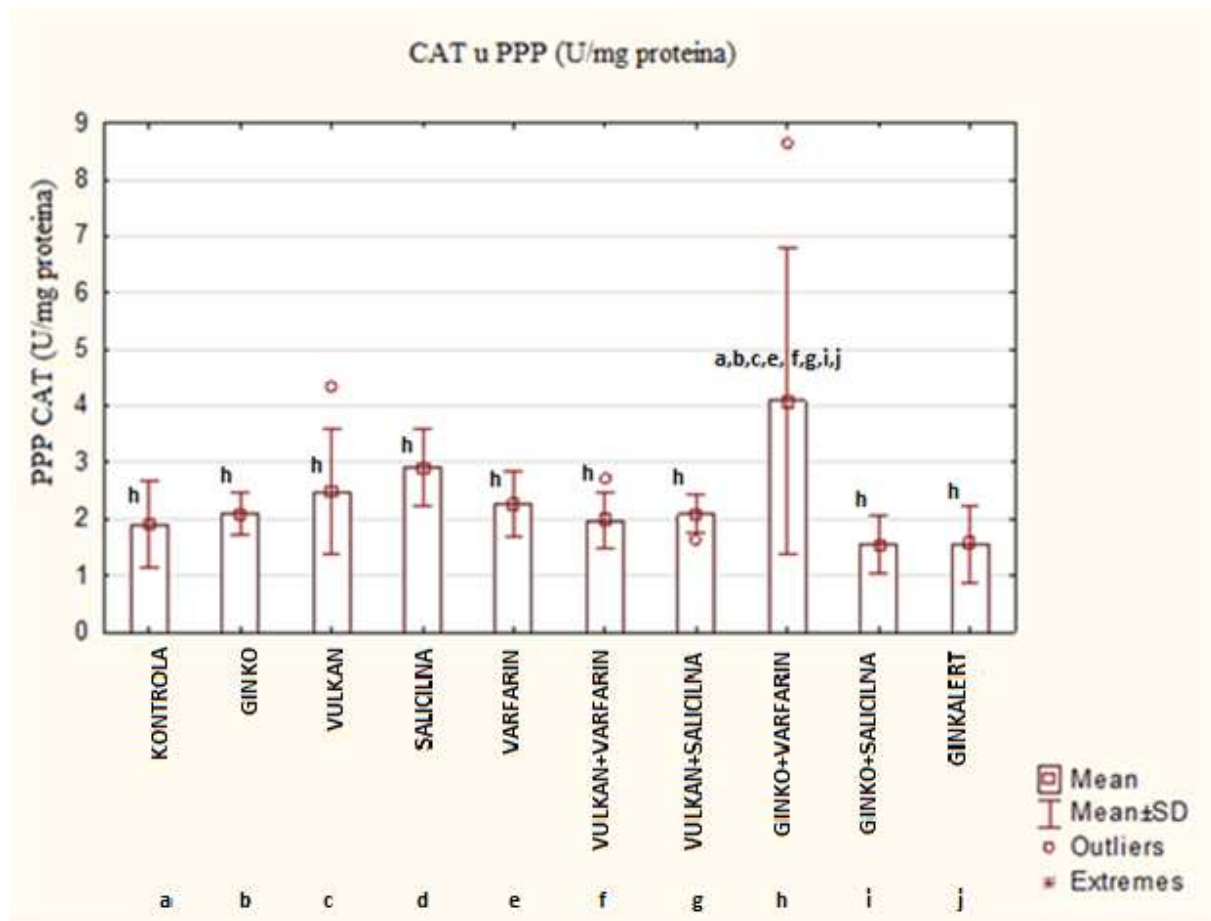
Slika 7. Prikaz aktivnosti SOD-a u RBC u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.

Tablica 4. Aktivnost enzima SOD u RBC, PRP i PPP

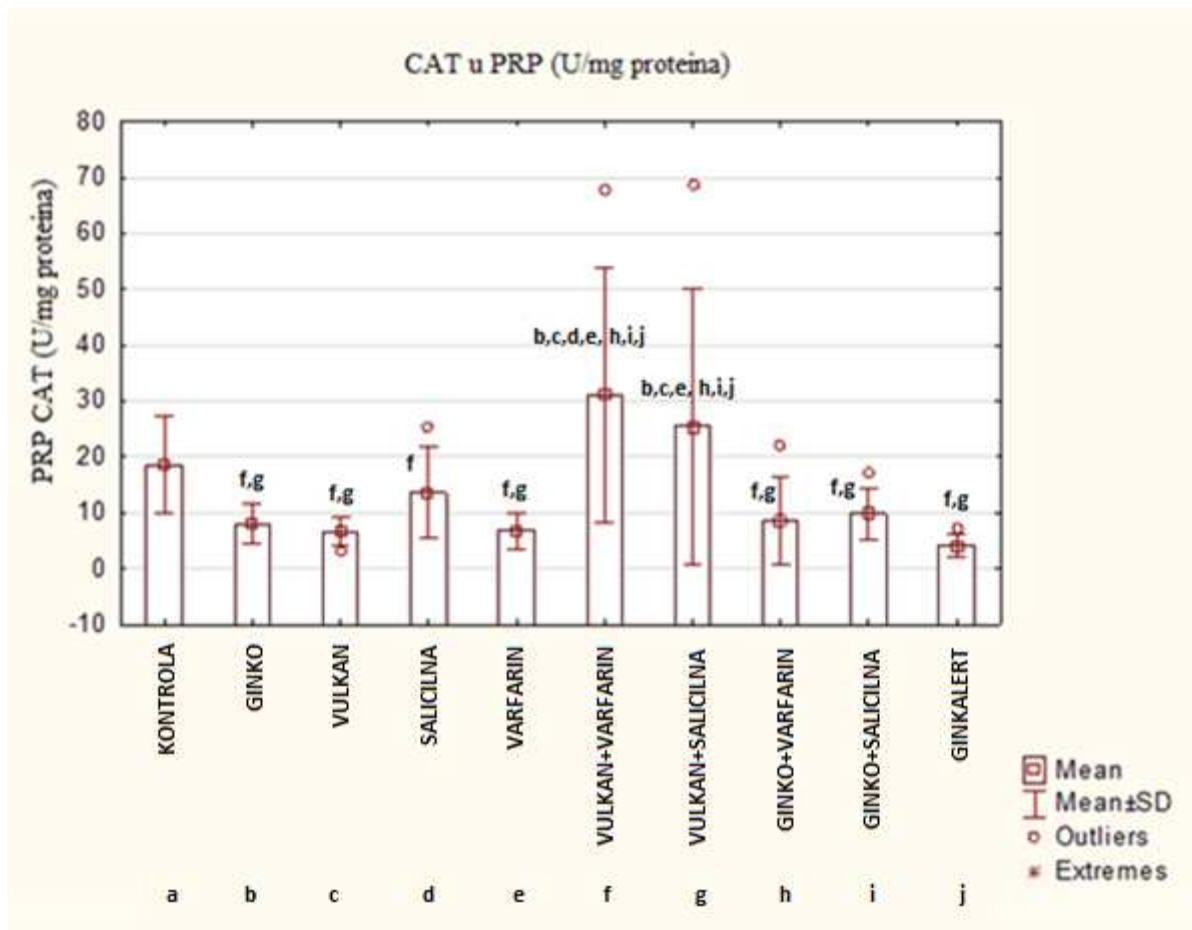
Vrijednosti medijana, min. i max. za SOD									
Oznaka skupine	RBC (U/mg Hb)			PRP (U/mg prot.)			PPP (U/mg prot.)		
	Medijan	Min.	Max.	Medijan	Min.	Max.	Medijan	Min.	Max.
0.Kontrola	0,836	0,703	0,892	1,606	1,213	1,979	0,881	0,397	1,231
1.Ginko	0,478	0,416	0,794	1,951	0,870	2,044	0,755	0,403	1,278
2.Vulkan	0,543	0,273	0,905	1,244	1,044	2,549	1,154	0,948	1,806
3.Salicilna	0,444	0,401	0,580	1,577	1,296	2,581	1,361	1,075	1,959
4.Varfarin	0,427	0,200	0,741	2,274	1,714	2,711	1,465	1,414	2,271
5.Vulkan+Varfarin	0,253	0,175	0,464	2,805	2,644	4,399	2,842	2,056	3,035
6.Vulkan+Salicilna	0,565	0,251	0,651	0,666	0,463	1,088	0,726	0,585	1,167
7.Ginko+Varfarin	0,403	0,223	0,777	0,782	0,595	0,977	1,062	0,403	1,914
8.Ginko+ Salicilna	0,322	0,163	0,424	0,519	0,330	0,602	1,029	0,595	1,239
9.Ginkalert	0,591	0,312	1,190	0,572	0,399	0,833	1,312	0,808	1,619

3.3. Aktivnost katalaze u uzorcima

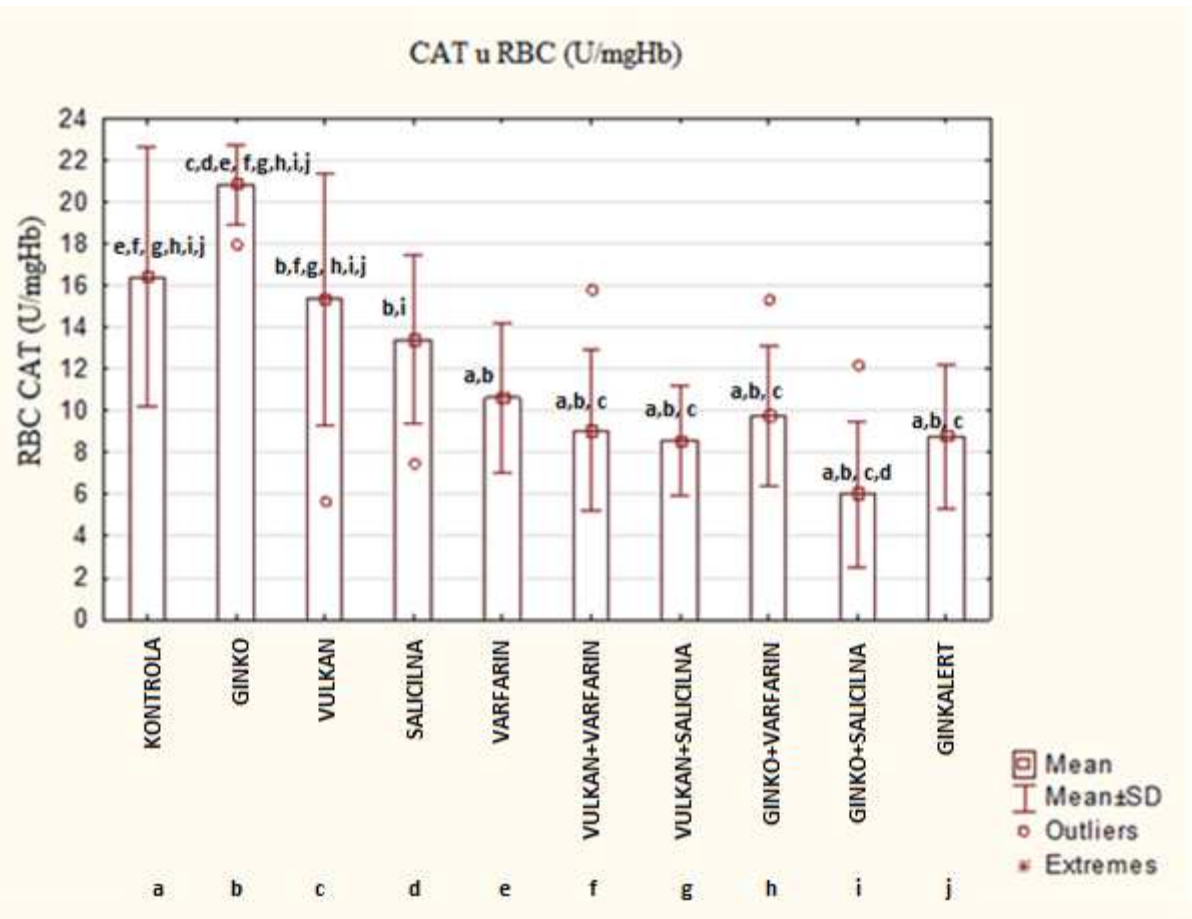
Mjerenje katalaze u PPP uzorcima skupine 7. Ginko+varfarin (2,973 U/mg proteina) je pokazalo povećanu aktivnost katalaze u odnosu na ostale skupine koje su podjednake sa 0. Kontrola skupinom (1,837 U/mg proteina) (Slika 8.). PRP skupine 5. Vulkan+varfarin (20,806 U/mg proteina) i 6. Vulkan+salicilna (15,183 U/mg proteina) pokazale su povećanu aktivnost katalaze u odnosu na skupine 1. Ginko (14,803 U/mg proteina), 2. Vulkan (6,845 U/mg proteina), 4. Varfarin (6,460 U/mg proteina), 7. Ginko+varfarin (5,400 U/mg proteina), 8. Ginko+salicilna (8,240 U/mg proteina) i 9. Ginkalert (2,909 U/mg proteina) dok je skupina 5. Vulkan+varfarin pokazala povećanu aktivnost i u odnosu na skupinu 3. Salicilna (10,245 U/mg proteina) (Slika 9.). RBC uzorci su pokazali različite aktivnosti katalaze za sve pokusne skupine. U odnosu na 0. Kontrola (15,850 U/mg Hb) skupinu nižu aktivnost su pokazale skupine 4. Varfarin (10,064 U/mg Hb), 5. Vulkan+varfarin (7,849 U/mg Hb), 6. Vulkan+salicilna (8,241 U/ mg Hb), 7. Ginko+varfarin (9,228 U/ mg Hb), 8. Ginko+ salicilna (4,561 U/mg Hb) 9. Ginkalert (7,857 U/mg Hb). U odnosu na 1. Ginko skupinu sve skupine osim 0. Kontrola i 2. Vulkan (15,627 U/mg Hb) su pokazale nižu aktivnost katalaze. Skupine 5. Vulkan+varfarin, 6. Vulkan+salicilna, 7. Ginko+varfarin, 8. Ginko+salicilna i 9. Ginkalert su pokazale nižu aktivnost u odnosu na skupinu 0. Kontrola, 1. Ginko i 2. Vulkan dok je skupina 8. Ginko+salicilna pokazala i nižu aktivnost u odnosu na skupinu 3. Salicilna (14,951 U/mg Hb) (Slika 10.) (Tablica 5.).



Slika 8. Prikaz aktivnosti katalaze u PPP u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.



Slika 9. Prikaz aktivnosti katalaze u PRP u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.



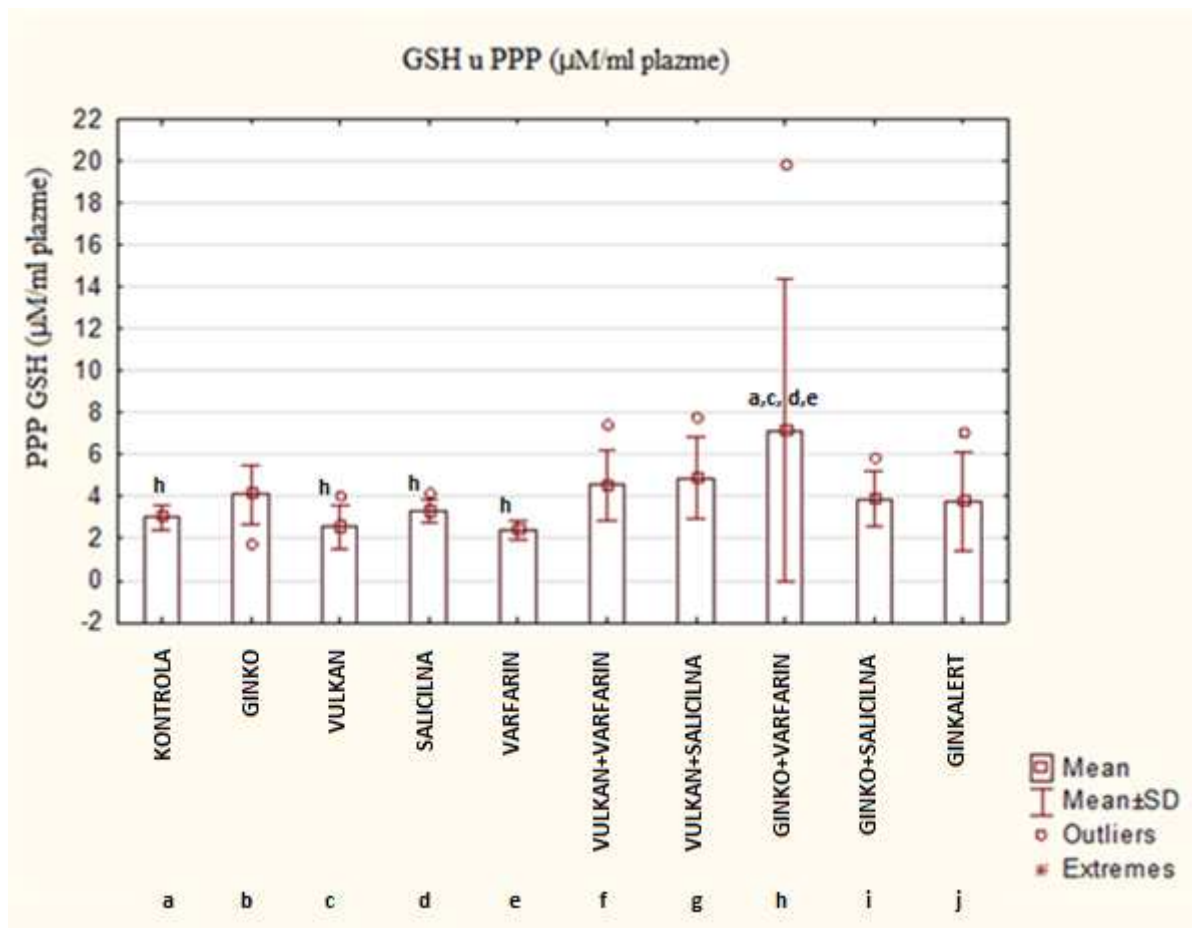
Slika 10. Prikaz aktivnosti katalaze u RBC u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.

Tablica 5. Aktivnost enzima katalaze (CAT) u RBC, PRP i PPP

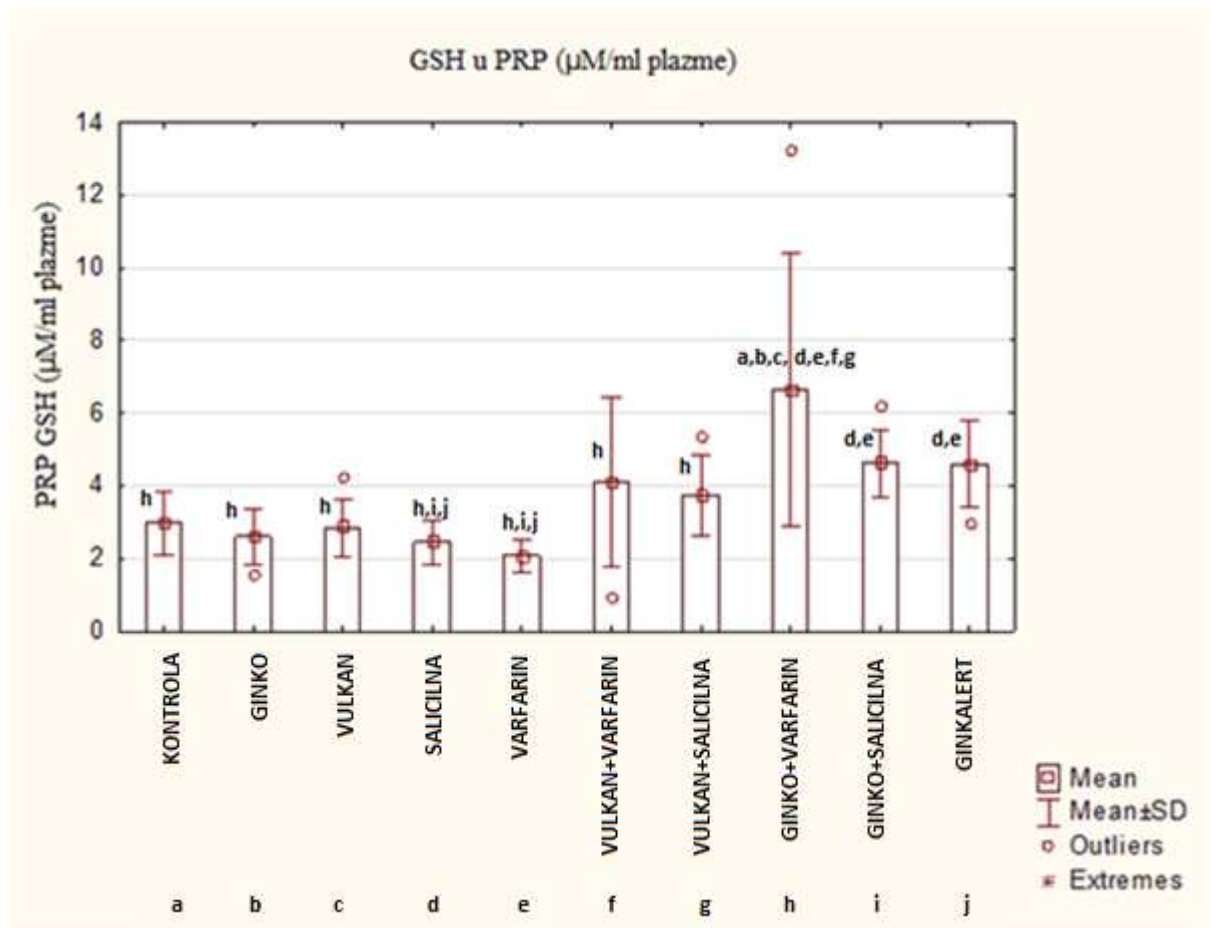
Vrijednosti medijana, min. i max. za CAT									
Oznaka skupine	RBC (U/mg Hb)			PRP (U/mg prot.)			PPP (U/mg prot.)		
	Medijan	Min.	Max.	Medijan	Min.	Max.	Medijan	Min.	Max.
0.Kontrola	15,850	10,383	23,607	14,803	13,201	31,422	1,837	1,087	2,810
1.Ginko	21,451	17,920	23,043	7,051	4,670	12,145	2,247	1,661	2,532
2.Vulkan	15,627	5,719	22,252	6,845	3,179	9,623	2,157	1,467	4,344
3. Salicilna	14,951	7,487	17,436	10,245	5,211	25,407	2,935	2,167	3,736
4.Varfarin	10,064	6,900	15,492	6,460	3,210	11,122	2,190	1,726	3,008
5.Vulkan+Varfarin	7,849	6,225	15,801	20,806	11,052	67,948	1,860	1,365	2,723
6.Vulkan+Salicilna	8,241	5,983	12,107	15,183	7,872	68,705	2,033	1,612	2,544
7.Ginko+Varfarin	9,228	6,725	15,315	5,400	2,642	22,127	2,973	1,909	8,619
8.Ginko+ Salicilna	4,561	4,190	12,244	8,240	5,044	17,159	1,691	1,017	2,146
9.Ginkalert	7,857	4,426	12,761	2,909	2,603	7,336	1,512	0,720	2,468

3.3. Koncentracija GSH

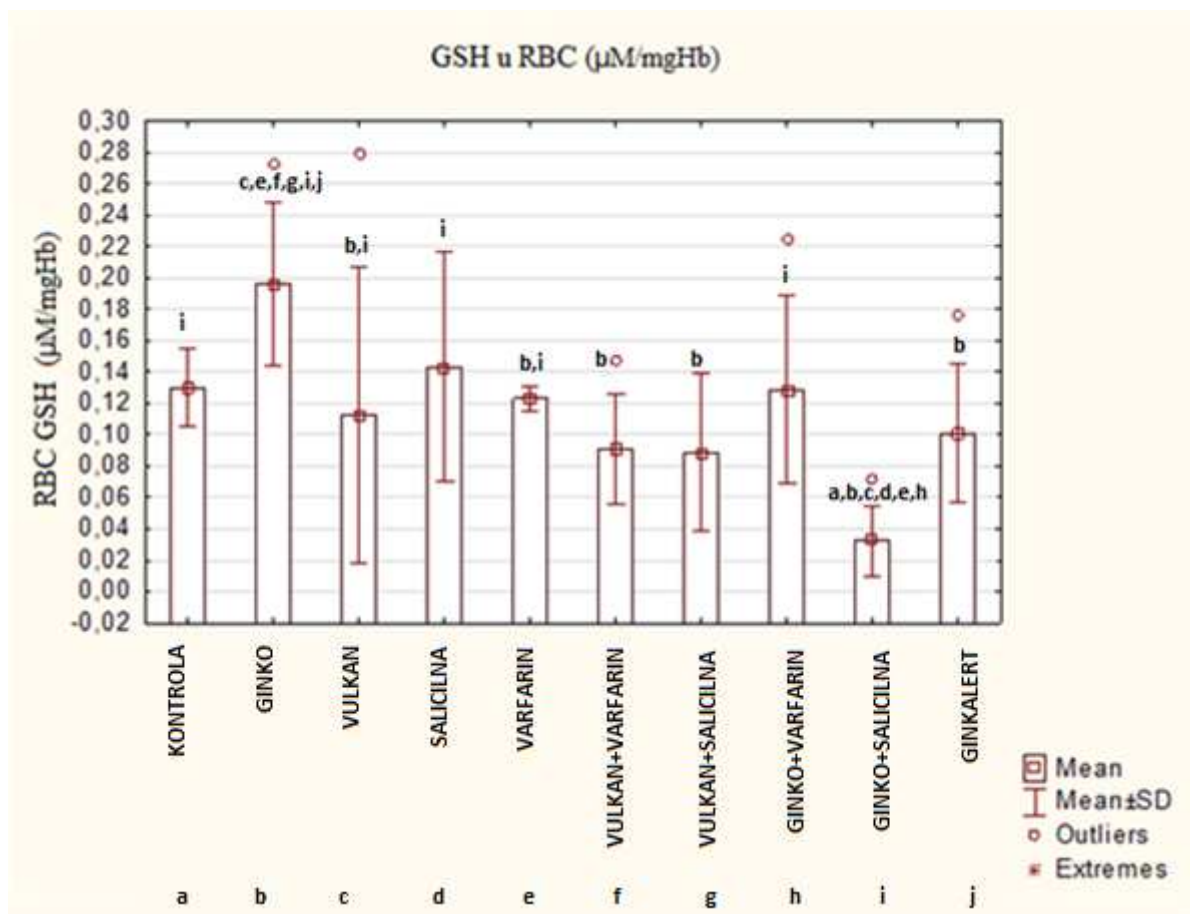
Mjerenja ukupne koncentracije GSH u uzorcima PPP pokazali su porast koncentracije GSH u skupini 7. Ginko+varfarin (4,760 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme) u odnosu na skupine 0. Kontrola (2,857 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme), 2. Vulkan (2,222 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme), 3. Salicilna (3,198 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme) i 4. Varfarin (2,551 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme) (Slika 11.). Uzorci PRP su također pokazali porast koncentracije GSH u skupini 7. Ginko+varfarin (5,258 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme) u odnosu na skupine 0. Kontrola (2,688 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme), 1. Ginko (2,535 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme), 2. Vulkan (2,512 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme), 3. Salicilna (2,535 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme), 4. Varfarin (1,948 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme), 5. Vulkan+varfarin (3,592 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme) i 6. Vulkan+ salicilna (3,920 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme). Dok su skupine 8. Ginko+salicilna (4,390 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme) i 9. Ginkalert (4,412 $\mu\text{M}/\text{mL}$ plazme) pokazali povišene koncentracije GSH u odnosu na skupine 3. Salicilna i 4. Varfarin (Slika 12.). Uzorci u RBC skupine 8. Ginko+salicilna (0,024 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb) su pokazali niže koncentracije enzima u odnosu na 0. Kontrola (0,129 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb), 1. Ginko (0,190 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb), 2. Vulkan (0,078 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb), 3. Salicilna (0,138 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb), 4. Varfarin (0,123 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb) i 8. Ginko+varfarin (0,105 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb). U odnosu na skupinu 1. Ginko skupine 2. Vulkan, 4. Varfarin, 5. Vulkan+varfarin (0,075 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb), 8. Ginko+salicilna i 9. Ginkalert (0,087 $\mu\text{M}/\text{mg}$ Hb) su pokazali nižu koncentraciju GSH (Slika 13.) (Tablica 6.).



Slika 11. Prikaz koncentracije GSH u PPP u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.



Slika 12. Prikaz koncentracije GSH u PRP: Na slici se vidi da skupina 7. Ginko+varfarin ima povišenu koncentraciju GSH u odnosu na 0. Kontrola skupinu. U odnosu na skupinu 1. Ginko, skupina 7. Ginko+varfarin pokazuje povišenu koncentraciju GSH. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju.



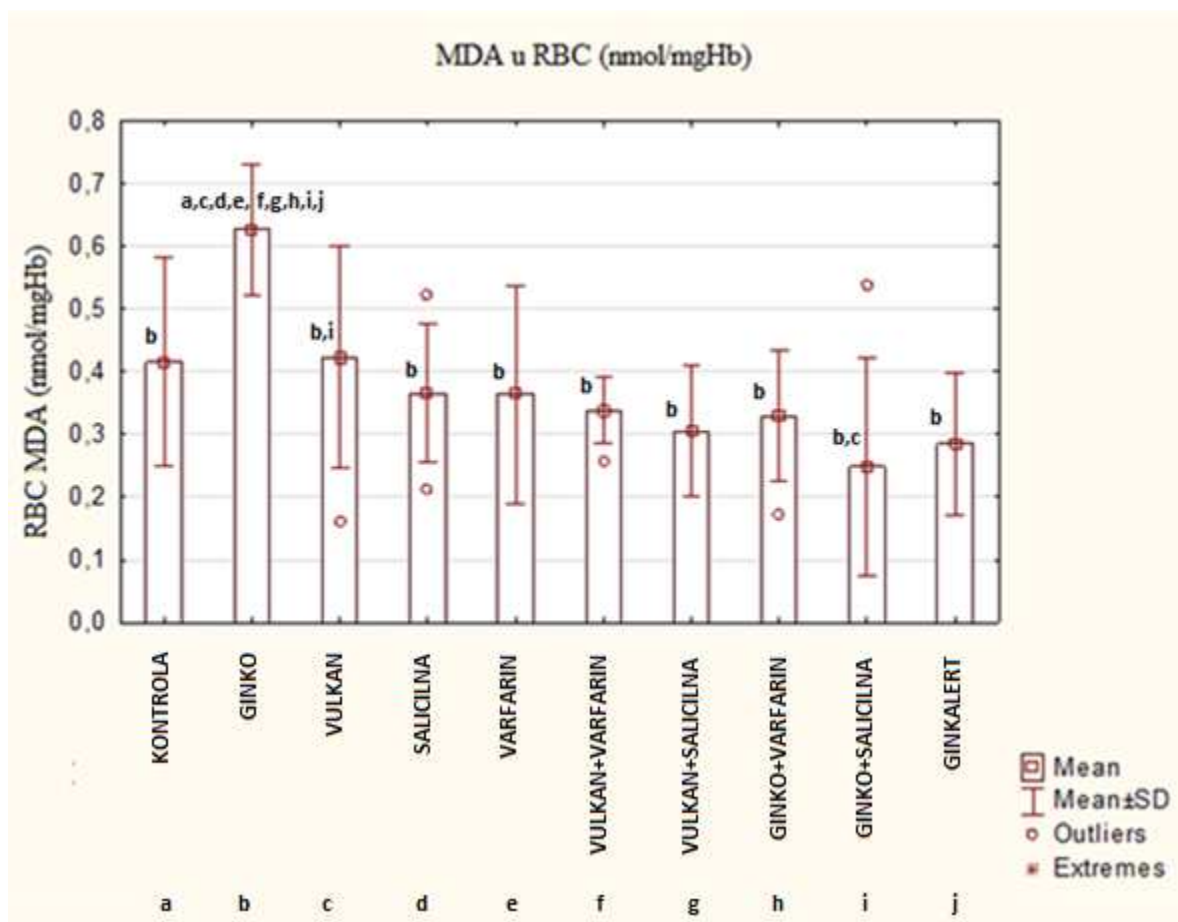
Slika 13. Prikaz koncentracije GSH u RBC u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.

Tablica 6. Ukupna koncentracija GSH u RBC, PRP i PPP

Vrijednosti medijana, min. i max. za GSH									
Oznaka skupine	RBC (µM/mg Hb)			PRP(µM/mL plazme)			PPP (µM/mL plazme)		
	Medijan	Min.	Max.	Medijan	Min.	Max.	Medijan	Min.	Max.
0.Kontrola	0,129	0,102	0,156	2,688	2,277	4,272	2,857	2,466	3,882
1.Ginko	0,190	0,134	0,272	2,535	1,526	3,521	4,297	1,782	5,493
2.Vulkan	0,078	0,051	0,278	2,512	2,301	4,225	2,222	1,587	4,077
3.Salicilna	0,138	0,059	0,238	2,535	1,808	3,122	3,198	2,564	4,174
4.Varfarin	0,123	0,113	0,129	1,948	1,690	2,723	2,551	1,807	2,856
5.Vulkan+Varfarin	0,075	0,056	0,147	3,592	0,893	6,455	4,223	3,174	7,446
6.Vulkan+Salicilna	0,068	0,029	0,152	3,920	2,465	5,352	4,712	2,465	7,763
7. Ginko+Varfarin	0,105	0,066	0,224	5,258	4,319	13,262	4,760	2,319	19,894
8.Ginko+Salicilna	0,024	0,017	0,072	4,390	3,827	6,161	4,028	2,612	5,810
9.Ginkalert	0,087	0,060	0,176	4,413	2,958	5,774	2,368	1,684	7,028

3.4. Koncentracija MDA u RBC

Mjerenje ukupne količine MDA u RBC pokazale su povećanu koncentraciju MDA u skupini 1. Ginko (0,635 nmol/mg Hb) u odnosu na sve pokusne skupine. Skupina 8. Ginko+salicilna (0,228 nmol/mg Hb) pokazala je manju koncentraciju MDA u odnosu na skupinu 2. Vulkan (0,505 mg Hb) (Slika 14.) (Tablica 7.).



Slika 14. Prikaz koncentracije MDA u RBC u ovisnosti o tretmanu. Slova ispod svake skupine su oznake za svaku skupinu. Slova iznad svakog stupca označavaju koje pojedine skupine se međusobno razlikuju prema ANOVA testu.

Tablica 7. Ukupna koncentracija MDA u RBC

Vrijednosti medijan, min. i max. za MDA RBC			
Oznaka skupine	RBC (nmol/mg Hb)		
	Medijan	Min.	Max.
0.Kontrola	0,432	0,229	0,568
1.Ginko	0,635	0,501	0,763
2.Vulkan	0,505	0,160	0,570
3.Salicilna	0,371	0,212	0,521
4.Varfarin	0,319	0,206	0,612
5.Vulkan+Varfarin	0,356	0,256	0,393
6.Vulkan+Salicilna	0,338	0,182	0,442
7.Ginko+Varfarin	0,371	0,172	0,437
8.Ginko+ Salicilna	0,228	0,102	0,539
9.Ginkalert	0,261	0,157	0,428

3.5. Sročeni prikaz promjena u uzorcima

U ovome djelu su prikazani sročeni rezultati promjena pojedinih markera oksidativnog stresa (SOD, katalaza, GSH i MDA) za sve pokusne skupine PPP (Tablica 8.), PRP (Tablica 9.) i RBC (Tablica 10.) uzorka u odnosu na kontrolu. Također su prikazane usporedbe skupina 1. Ginko s skupinama 7.Ginko+varfarin i 8. Ginko+salicilna za PPP(Tablica 11.), PRP(Tablica 12.) i RBC(Tablica 13.) uzorke te skupne 2. Vulkan s skupina 5. Vulkan + varfarin i 6. Vulkan + salicilna za PPP(Tablica 14.), PRP(Tablica 15.) i RBC(Tablica 16.) uzorke.

Tablica 8. Promjene u skupinama PPP u odnosu na 0. Kontrola

PPP	Ginko	Vulkan	Salicilna	Varfarin	Vulkan + Varfarin	Vulkan + Salicilna	Ginko + Varfarin	Ginko + Salicilna	Ginkalert
GSH	0	0	0	0	0	0	↑	0	0
SOD	0	0	↑	↑	↑	0	0	0	0
KAT	0	0	0	0	0	0	↑	0	0
Ukupni proteini	↑	0	0	0	0	0	0	0	0

0 označava statistički jednaku vrijednost uzorka i kontrole, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na kontrolu, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na kontrolu, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na kontrolu, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na kontrolu

Tablica 9. Promjene u skupinama PRP u odnosu na 0. Kontrola

PRP	Ginko	Vulkan	Salicilna	Varfarin	Vulkan + Varfarin	Vulkan + Salicilna	Ginko + Varfarin	Ginko + Salicilna	Ginkalert
GSH	0	0	0	0	0	0	↑	0	0
SOD	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KAT	0	0	0	0	↑	↓	↓	↓	↓

0 označava statistički jednaku vrijednost uzorka i kontrole, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na kontrolu, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na kontrolu, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na kontrolu, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na kontrolu

Tablica 10. Promjene u skupinama RBC u odnosu na 0. Kontrola

RBC	Ginko	Vulkan	Salicilna	Varfarin	Vulkan + Varfarin	Vulkan + Salicilna	Ginko + Varfarin	Ginko + Salicilna	Ginkalert
GSH	0	0	0	0	0	0	0	↓	0
SOD	0	0	↓	↓	↓	↓	↓	↓	0
KAT	0	0	0	↓	↓	↓	↓	↓	↓
MDA	↑	0	0	0	0	0	0	0	0

0 označava statistički jednaku vrijednost uzorka i kontrole, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na kontrolu, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na kontrolu, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na kontrolu, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na kontrolu

Tablica 11. Promjene u skupinama PPP u odnosu na 1. Ginko

PPP	Ginko+Varfarin	Ginko+ Salicilna
GSH	↑	0
KATALAZA	0	0
SOD	0	0
Ukupni proteini	↓	0

0 označava statistički jednaku vrijednost skupine 1. Ginko i uzoraka, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko

Tablica 12. Promjene u skupinama PRP u odnosu na 1. Ginko

PRP	Ginko+Varfarin	Ginko+ Salicilna
GSH	↑	0
KATALAZA	0	0
SOD	↓	↓

0 označava statistički jednaku vrijednost skupine 1. Ginko i uzoraka, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko

Tablica 13. Promjene u skupinama RBC u odnosu na 1. Ginko

RBC	Ginko+Varfarin	Ginko+ Salicilna
GSH	0	↓
KATALAZA	↓	↓
SOD	0	0
MDA	↓	↓

0 označava statistički jednaku vrijednost skupine 1. Ginko i uzoraka, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 1. Ginko

Tablica 14. Promjene u skupinama PPP u odnosu na 2.Vulkan

PPP	Vulkan+Varfarin	Vulkan + Salicilna
GSH	0	0
KATALAZA	0	0
SOD	↑	↓
Ukupni proteini	0	0

0 označava statistički jednaku vrijednost skupine 2. Vulkan i uzoraka, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan

Tablica 15. Promjene u skupinama PRP u odnosu na 2.Vulkan

PRP	Vulkan+Varfarin	Vulkan + Salicilna
GSH	0	0
KATALAZA	↑	↑
SOD	↑	↓

0 označava statistički jednaku vrijednost skupine 2. Vulkan i uzoraka, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan

Tablica 16. Promjene u skupinama RBC u odnosu na 2.Vulkan

RBC	Vulkan+Varfarin	Vulkan + Salicilna
GSH	0	0
KATALAZA	↓	↓
SOD	0	0
MDA	0	0

0 označava statistički jednaku vrijednost skupine 2. Vulkan i uzoraka, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↑ označava povećanu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka do jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan, ↓ označava smanjenu vrijednost uzorka za više od jedan put u odnosu na skupinu 2. Vulkan

4. Rasprava

Oksidativni stres nastaje kao posljedica neravnoteže između antioksidativnog sustava organizma i vanstaničnih i staničnih oksidirajućih događaja. Promjene u oksidativnom statusu organizma dovode i do promjene antioksidativnih biomarkera. U ovome istraživanju smo proučavali djelovanje potencijalnih antioksidativnih suplemenata hrani i antihemostatskih lijekova samostalno i u kombinaciji. U usporedbi sa 0. Kontrola skupinom došlo je do različitih promjena u biomarkerima oksidativnog stresa u PPP, PRP i RBC uzorcima.

Primjena preparata *Ginkgo biloba* je pokazala značajne utjecaje na sveukupni antioksidativni status organizma. Doveda je do širokog raspona ukupnih proteina u skupini tretiranoj sa Ginkocelom te do povećanja ukupnog MDA u RBC. Povećana razina MDA u RBC je vjerojatno posljedica *Ginkgo biloba* koji povećava aktivnosti hemoxygenaze HO-1 (Chen i sur. 2001.), pri čemu dolazi do povećanog lučenja prooksidansa koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju. Širok raspon ukupnih proteina djelomično možemo objasniti modulacijskim učinkom EGB 761 na proteosomsku aktivnost i na poliglutaminsku proteinsku agregaciju, koju su opisali Stark i Behel (2014.). Primjenom preparata Vulkan nije došlo do značajnijih promjena u odnosu na kontrolnu skupinu. Primjena acetilsalicilne kiseline dovela je do promjena u uzorcima PPP i RBC. U PPP uzorku primjena acetilsalicilne kiseline dovela je do povećanja aktivnosti SOD-a, dok je u RBC došlo do smanjene aktivnosti SOD-a. To se može objasniti povećanjem oksidativnog stresa koji slijedi brzim ulaskom acetilsalicilne kiseline u eritrocite, gdje se zbiva hidroliza acetilsalicilne kiseline. Ulaskom u eritrocite smanjuje se oksidativni stres u plazmi što objašnjava povećanu aktivnost SOD-a u plazmi. Hidrolizu acetilsalicilne kiseline provodi enzim acetilkolinesteraza (Zhou i sur. 2011.) pri čemu se oslobađa hidroksidni i kiseli radikali (Edwards 1952.) koji mogu dovesti do oštećenja SOD-a. Primjena varfarina je dovela do promjenama u antioksidativnih biomarkera u PPP i RBC uzorcima. U PPP uzorku je primjena varfarina dovela do znatnog povećanja aktivnosti SOD-a dok je u RBC uzorku došlo do smanjene aktivnosti SOD-a i katalaze. Povećana aktivnost SOD-a u PPP je moguća posljedica metaboliziranja varfarina u jetri pri čemu dolazi do inhibicije koagulacijskih čimbenika u plazmi. Smanjena koagulacijska učinkovitost plazme kao posljedicu može imati povećano krvarenje organizma što dovodi do povećane razine oksidativnog stresa i slabije reparacije stanica. Oštećene stanice se pri tome odstranjuju iz organizma putem makrofaga pri čemu dolazi do inflamatorne reakcije i povećanog lučenja ROS-a. ROS oslobođen u plazmu može djelovati i na RBC što može objasniti smanjenu

razinu aktivnosti katalaze i SOD-a, koji djelovanjem ROS-a mogu bit oštećeni. Primjena Ginkalerta u skupini 9. Ginkalert dovela je do smanjene aktivnosti katalaze u PRP i RBC uzorcima. Ovi rezultati sugeriraju da preparat Ginkalerta ima pojačano djelovanje na krvne stanice. Budući da je ginkoalert mješavina *Ginkgo biloba*, Gotu kola i borovnice, a *Ginkgo biloba* nije pokazao značajan utjecaj na aktivnost katalaze, za pretpostaviti je da je ovaj utjecaj na katalazu posljedica kombiniranog djelovanja *Ginkgo biloba*, Gotu kole i borovnice. Antocijani iz borovnice su poznati po povećanju aktivnosti enzima hemoksigenaze-1 (HO-1) (Milbury i sur. 2007.). Postoje i dokazi koji potvrđuju da *Ginkgo biloba* također ima stimulatorno djelovanje na sintezu HO-1 (Chen i sur. 2001.). Stoga je za pretpostaviti da je zajedničko djelovanje *Ginkgo biloba* i antocijana iz borovnice potaknulo pojačano lučenje HO-1. HO-1 je enzim koji katalizira razgradnju hem skupine iz hemoglobina na biliverdin, Fe^{2+} i CO (Chauveau i sur. 2005.). Fe^{2+} i CO su poznati prooksidansi te vjerojatno direktno potiču oksidativna oštećenja katalaze u RBC. CO pasivnom difuzijom izlazi iz eritrocita i ulazi u trombocite gdje svojim prooksidativnim djelovanjem može dovesti do oštećenja katalaze mehanizmom karbonilacije enzima.

U usporedbi sa skupinom 1. Ginko gdje su sve životinje tretirane samo Ginkocelom skupine 7. Ginko+varfarin i 8. Ginko+salicilna su pokazali različite rezultate u uzorcima PRP, PPP i RBC. U odnosu na 1. Ginko skupinu, skupina 7. Ginko+varfarin je pokazala povećanu koncentraciju GSH u PRP i PPP uzorcima, sniženu aktivnost SOD-a u PRP uzorku, manju količinu ukupnih proteina te smanjenu razinu MDA u RBC. Veća aktivnost GSH u PPP i PRP i snižena aktivnost SOD-a u PRP upućuje na povećanu razinu vodikovog peroksida i lipidnih hidroperoksida u trombocitima, što može biti posljedica djelovanja varfarina koji se slabije razgrađuje u jetri zbog inhibitornog djelovanja EGb 761 na glavne ljudske citokrom P450 enzime CYP2C9, CYP1A2, CYP2E1 i CYP3A4 koji sudjeluju u metaboliziranju varfarina (Taki i sur. 2012., Samuels 2005.). Manja razina MDA u odnosu na skupinu 1. Ginko moguća je posljedica djelovanja varfarina koji može dovesti do smanjene pokretljivosti i zgušnjavanja lipidne membrane (Amin i sur. 1986.) te zbog toga prooksidansi nastali djelovanjem HO-1 teže dolaze do lipida u membrani. Manja količina ukupnih proteina u 7. Ginko+varfarin skupini se može povezati s inhibitornim djelovanjem varfarina na neke plazmatske proteine, što je moglo dovesti do slabije osjetljivosti Folin & Ciocalteu's fenolnog reagensa. Smanjena aktivnost SOD-a u trombocitima skupine 8. Ginko+salicilna vjerojatno je posljedica direktnog inhibitornog djelovanja acetilsalicilne kiseline na COX-1 enzim (Goodman i sur. 2008.). Smanjena aktivnost katalaze u RBC je moguća posljedica djelovanja prooksidansa nastalih djelovanjem HO-1 potaknutog djelovanjem *Ginkgo biloba*. Dok manja razina GSH i MDA u

RBC upućuju na smanjenu razinu lipidnih hidroperoksida i lipidne peroksidacije što se može povezati sa antiinflamatornim djelovanjem acetilsalicilne kiseline.

Kada usporedimo skupinu 2. Vulkan u kojoj su sve životinje primale samo vulkan sa skupinama 5. Vulkan+varfarin i 6. Vulkan+salicilna vidljive su razlike u PPP, PRP i RBC uzorcima. Povećana aktivnost SOD-a u PRP i PPP uzorcima skupine 5. Vulkan+varfarin sugerira da je došlo do povećane aktivnosti (EC)-SOD-a. Što može biti posljedica pojačanog krvarenja uzrokovanog međudjelovanjem varfarina i aktivnih tvari iz vulkana. Usporedbom mjerenja skupine 5. Vulkan+varfarin i 7. Ginko+varfarin vidljivo je da interakcija između varfarina i *Ginko bilobe* nije direktan uzročnik povećane aktivnosti SOD-a. Suprotno tome usporedbom aktivnosti SOD-a za skupne 6. Vulkan+salicilna i 8. Ginko+salicilna vidljiv je pad aktivnosti SOD-a u oba uzorka što se može povezati s djelovanjem *Ginkgo biloba*. Ovo opažanje sugerira da je djelovanje vulkana potpomognuto drugom aktivnom tvari iz sastava vulkana. Povećana aktivnost katalaze u PRP uzorcima skupine 5. Vulkan+varfarin u odnosu na skupinu 2. Vulkan, sugeriraju da i varfarin ima pozitivan učinak na aktivnost katalaze. Sam mehanizam ovog međudjelovanja nije jasan, ali moguće je da je posljedica modulacijskog i antioksidativnog djelovanja origana i hmelja (Liang i sur. 2012., Olas i sur. 2012.). Smanjena aktivnost SOD-a u PRP uzorcima skupine 6. Vulkan+salicilna može biti i posljedica antioksidativnog djelovanja acetilsalicilne kiseline pri čemu dolazi do smanjene razine kardiovaskularnog O^{2-} (Wu i sur. 2012.). Smanjena aktivnost katalaze u RBC uzorcima skupina 5. Vulkan+varfarin i 6. Vulkan+salicilna je moguća posljedica djelovanja prooksidansa nastalih djelovanjem HO-1 nastalog djelovanjem *Ginkgo biloba* (Chen i sur. 2001.).

5. Zaključci

Iako je u javnosti uvriježeno mišljenje da su prirodni suplementi prehrani bezopasni rezultati ovog istraživanja su pokazali da je potreban povećani oprez u njihovom korištenju i konzultacija sa liječnicima.

Ovo istraživanje je potvrdilo da postoji niz mogućih interakcija između vazodilatacijskih suplemenata i primjene antihemostatskih lijekova. Kombinirano djelovanje je dovelo do velikih promjena u antioksidativnom statusu organizma, te je potrebno ograničiti istovremenu primjenu antihemostatika i vazodilatacijskih suplemenata.

Potrebno je provesti dodatna istraživanja o utjecaju interakcije vazodilatacijskih suplemenata i antihemostatskih lijekova na antioksidativni sustav.

6. Literatura

1. Aebi H. (1984.): Catalase in vitro. *Methods in Enzimology* **105**: 121.-126.
2. Amin T.M., Siris J.A., Allen B.V., Colles C.M. (1986.): Effects of warfarin on blood rheology in navicular disease. *Research in Veterinary Science* **40**: 308.-312.
3. Baille T.A., Slatter J.G. (1991.): Glutathione: A Vehicle for the Transport of Chemically Reactive Metabolites *in vivo*. *Accounts of Chemical Research* **24**: 264.-270.
4. Bayat M., Tameh A.A., Ghahremani M.H., Akbari M., Mehr S.E., Khanavi M., Hassanzadeh G. (2012.): Neuroprotective properties of *Melissa officinalis* after hypoxic-ischemic injury both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **20**: 1.-10.
5. Bent S., Goldberg H., Paduka A., Avins A.L. (2005.): Spontaneous Bleeding Associated with Ginkgo biloba. A Case Report and Systematic Review of the Literature. *Journal of General Internal Medicine* **20**: 657.-661.
6. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2002.): Biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York
7. Bornsek S.M., Ziberna L., Polak T., Vanzo A., Ulrich N.P., Abram V., Tramer F., Passamonti S. (2012.): Bilberry and blueberry anthocyanins act as powerful intracellular antioxidants in mammalian cells. *Food Chemistry* **134**: 1878.-1884.
8. Chauveau C., Remy S., Royer P.J., Hill M., Tanguy-Royer S., Hubert F.X., Tesson L., Brion R., Beriou G., Gregorie M., Joslen R., Cuturi M.C., Angeon I. (2005.): Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and pro-inflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* **106**: 1694.-1702.
9. Chen J.X., Zheng H., Chen X., Su C.Y., Lai C.C. (2001.): Induction of heme oxygenase-1 by Ginkgo biloba extract but not its terpenoids partially mediated its protective effect against lysophosphatidylcholine-induced damage. *Pharmacological Research* **43**: 63.-69.
10. Cho H.J., Nam K.S. (2007.): Inhibitory effect of Ginkgolide B on platelet aggregation in cAMP and cGMP-dependent manner by activated MMP-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **40**: 678.-683.

11. Chu W., Cheung S.C.M., Lau R.A.W. (2011): Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). U: Benzie I.F.F., Wachtel-Galor S. (ur.): Herbal Medicine: Bimolecular and Clinical Aspects., CRC Press, Boca Raton
12. Ebadi M. (2002.): Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine. CRC Press, Boca Raton
13. Edwards L.J. (1952.): The hydrolysis of aspirin. *Transactions of the Faraday Society* **48**: 696.-699.
14. Flohé L., Ötting F. (1971.): Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology* **105**: 70.-76.
15. Fowler J.S., Wang G.J., Volkow N.D., Logan J., Franceschi D., Franceschi M., MacGregor R., Shea C., Graza V., Liu N., Ding Y.S. (2000.): Evidence that Ginkgo biloba extract does not inhibit MAO A and B in living human brain. *Life Science* **66**: 141.-146.
16. Furman A.E.F., Henneberg R., Hermann P.B., Leonart M.S.S., do Nascimento J. (2012.): *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) attenuates oxidative stress induction in erythrocytes of sickle cell disease patients. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **48**: 659.-665.
17. Ge B., Zhang Z., Zuo Z. (2014.): Review Article: Updates on the Clinical Evidenced Herb-Warfarin Interactions. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**: 1.-18.
18. Glimn-Lacy J., Kaufman P.B. (2006.): Botany Illustrated. Springer Science+Business Media Inc., New York.
19. Goodman T., Ferro A., Sharma P. (2008.): Pharmacogenetics of aspirin resistance: a comprehensive systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology* **66**: 222.-232.
20. Huang S.Y., Jeng C., Kao S.C., Yu J.J.H., Liu D.Z. (2004.): Improved haemorrhological properties by *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) in type 2 diabetes mellitus complicated retinopathy. *Clinical Nutrition* **23**: 615.-621.
21. Jakesevic M., Aaby K., Borge G. I. A., Jeppsson B., Ahmé S., Molin G. (2011.): Antioxidative protection of dietary bilberry, chokeberry and *Lactobacillus plantarum* HEAL19 in mice subjected to intestinal oxidative stress by ischemia-reperfusion. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **11**: 1.-8.

22. Jayakumar T., Thomas P.A., Geraldine P. (2007.): Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. On antioxidants of major organs of aged rats. *Experimental Gerontology* **42**: 183.-191.
23. Jiang X., Williams K.M., Liauw W.S., Ammit A.J., Roufogalis B.D., Duke C.D., Day R.O., McLachlan A.J. (2004.): Effect of ginkgo and ginger on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology* **59**: 425.-432.
24. Kawthalkar S.M. (2006.): *Essentials of Haematology*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) LTD, New Delhi
25. Lewis R.J., Trager W.F., Chan K.K., Breckenridge A., Orme M., Roland M., Schary W. (1974.): Warfarin: Stereochemical aspects of its metabolism and interaction with phenylbutazone. *The Journal of Clinical Investigations* **53**: 1607.-1617.
26. Liang C.H., Chan L.P., Ding Y.H., So E.C., Lin R.J., Wang H.M., Chen Y.G., Chou T.H. (2012): Free radical scavenging activity of 4-(3,4-dihydroxybenzoyloxymethyl)phenyl-O- β -D-glucopyranoside from *Origanum vulgare* and its protection against oxidative damage. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **60**: 7690.-7696.
27. Lovrić J., Mesić M., Macan M., Koprivanac M., Kelava M., Bradamante V. (2008.): Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Periodicum Biologorum* **110**: 63.-67.
28. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951.): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265.-275.
29. Mansour A.S., Mossa A.T.H. (2009.): Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **93**: 34.-39.
30. Milbury P.E., Graf B., Curran-Celentano J.M., Blumberg J.B. (2007.): Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) Anthocyanins Modulate Heme Oxygenase-1 and Glutathione S-Transferase-pi Expression in ARPE-19 Cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **48**: 2343.-2349.
31. Miyamoto S., Arai H., Terao J. (2010.): *Enzymatic Antioxidant Defenses*. U: Aldini G., Yeum K.J., Niki E., Russell R.M. (ur.) *Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Applications*. Ames, Blackwell Publishing

32. Olas B., Kolodziejczyk J., Wachowicz B., Jędrejek D., Stochmal A., Oleszek W. (2011.): The extract from hop cones (*Humulus lupulus*) as a modulator of oxidative stress in blood platelets. *Platelets* **22**: 345.-352.
33. Orhan I.E. (2012.): *Centella asiatica* (L.) Urban: From Traditional Medicine to Modern Medicine with Neuroprotective Potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**: 1.-8.
34. Pakdeechote P. Bundupha S., Kukongviriyapan U., Prachaney P, Khrisanapant W., Kukongviriyapan V. (2014.): Asiatic Acid Alleviates Hemodynamic and Metabolic Alterations via Restoring eNOS/iNOS Expression, Oxidative Stress and Inflammation in Diet Induced Metabolic Syndrome Rats. *Nutrients* **6**: 355.-370.
35. Preedy V.R. (2014.): Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. Academic Press, Oxford
36. Raza H., John A. (2012.): Implications of Altered Glutathione Metabolism in Aspirin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells. *PLoS One* **7**: 1.-14.
37. Samuels N. (2005.): Herbal remedies and anticoagulant therapy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **93**: 3.-7.
38. Ścibior D., Czeczot H. (2006.): Catalase: structure, properties, functions. *Postępy Higieny Medycyny Doświadczalnej* **60**: 170.-180.
39. Scott S.A.; Lubitz S.A. (2014.): Warfarin pharmacogenetic trials: is there a future for pharmacogenetic-guided dosing?. *Pharmacogenomics* **15**: 719.-722.
40. Seis H. (1997.): Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress: Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology* **82**: 291.-295.
41. Stark M., Behl C. (2014.): The *Ginkgo biloba* Extract Egb 761 Modulates Proteasome Activity and Polyglutamine Protein Aggregation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**: 1.-14.
42. Taki Y., Yokotani K., Yamada S., Shinozuka K., Kubota Y., Watanabe Y., Umegaki K. (2012.): Ginkgo biloba extract attenuates warfarin-mediated anticoagulation through induction of hepatic cytochrome P450 by bilobalide in mice. *Phytomedicine* **19**: 177.-182.
43. Tietze F. (1969.): Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* **27**: 502.-520.

44. Wu R., Yin D., Sadekova N., Deschepper C.F., de Champlen J., Girouard H. (2012.): Research Article: Protective Effects of Aspirin from Cardiac Hypertrophy and Oxidative Stress in Cardiomyopathic Hamsters. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012**: 1.-8.
45. Zhao Y., Shu P., Zhang Y., Lin L., Zhou H., Xu Z., Suo D., Xie A., Jin X. (2014.): Effecte of *Centella asiatica* on Oxidative Stress and Lipid Metabolism in Hyperlipidemic Animal Models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2014**: 1.-7.
46. Zhou G., Marathe G.K., Willard B., McIntyre T.M. (2011.): Intracellular Erythrocytes Platelet-activating Factor Acetylhydrolase I Inactivates Aspirin in Blood. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 34820.-34829.