

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Aleksandra I. Konić Ristić

**UTICAJ BILJNIH POLIFENOLA NA  
AKTIVACIJU TROMBOCITA I NJIHOVU  
AGREGACIJU SA ĆELIJAMA  
ENDOTELA, KRVNIM I MALIGNIM  
ĆELIJAMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Aleksandra I. Konić Ristić

**THE IMPACT OF PLANT POLYPHENOLS  
ON PLATELET ACTIVATION AND THEIR  
AGGREGATION WITH ENDOTHELIAL,  
BLOOD AND MALIGNANT CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije

---

Prof. dr Ivan Stanković, redovni profesor, mentor  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Ivanka Miletić, profesor emeritus,  
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

---

Dr sc. Katarina Šavikin, naučni savetnik,  
Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd

---

Dr sc. Marija Glibetić, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu –Institut za medicinska istraživanja

---

Dr sc. Tatjana Srđić-Rajić, viši naučni saradnik,  
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd

## ZAHVALNICA

*Svom mentoru, redovnom profesoru dr Ivanu Stankoviću, izražavam duboko poštovanje i veliku zahvalnost za preneto znanje iz oblasti Bromatologije, stalnu podršku tokom izrade ovog rada, blago usmeravanje, ogromno poverenje i strpljenje, datu slobodu u izboru teme, vredne savete i nesebičnu pomoć.*

*Profesoru emeritusu dr Ivanki Miletić izražavam duboko poštovanje i veliku zahvalnost za prenesenu ljubav prema nauci o hrani, za ogromnu odgovornost koju ima prema mladim saradnicima i njihovom ličnom i profesionalnom razvoju, za poverenje i poštovanje, za nesebičnu pomoć tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije, ogroman trud i zalaganje i podršku u trenucima kada mi je bila najpotrebnija.*

*Dr Mariji Glibetić najiskrenije se zahvaljujem na ogromnom trudu, vremenu i strpljenju tokom izrade rada i sveukupne profesionalne saradnje, na izuzetnoj pomoći u eksperimentalnom radu i na prenešenom znanju u oblasti nauke i hrani i ishrani, izvanrednim profesionalnim iskustvima koje mi je pružila tokom rada u njenom timu, kao i nesebičnoj i stalnoj profesionalnoj i prijateljskoj podršci i poverenju. Posebno hvala što me je uvela u oblast istraživanja različitih uticaja na funkciju trombocita i konstantnoj podršci u mom profesionalnom razvoju.*

*Dr Katarini Šavikin iskreno se i od srca zahvaljujem za preneto znanje u oblasti farmakognozije i aktivno učešće u osmišljavanju i izvođenju dela eksperimentalnog rada, tumačenju i prezentovanju dobijenih rezultata, ogroman trud uloženi u moj rad na ovoj tezi nesebično prenošenje iskustava i razvijanje svesti o odgovornosti u naučnom radu, stalno usmeravanje, podršku, poštovanje i poverenje.*

*Dr Tatjani Srdić-Rajić, mom učitelju i iskrenom prijatelju od srca se zahvaljujem na ogromnom naučnom znanju koje mi je prenela tokom rada na ovoj disertaciji, pomoći u svakom koraku eksperimentalnog rada i tumačenju rezultata, na nesebičnosti i plemenitosti i osećaju odgovornosti za kolege i svakodnevnoj prijateljskoj podršci.*

*Mojim kolegama mr pharm. Neveni Kardum i Filipu Stojanoviću od srca se zahvaljujem za pomoći u eksperimentalom radu i konstantnoj prijateljskoj podršci tokom izrade doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se svim dobrovoljcima, uključujući i sve drage prijatelje, koji su učestvovali u dijetarnim interventnim studijama prikazanim u okviru ove disertacije..*

*Od srca se zahvaljujem svom prijatelju i kumi Miroslavi Bosiljčić na podršci u svakom trenutku izrade ove disertacije, kao i u svim drugim trenucima, ogromnoj ljubavi i poverenju u mene i moj rad.*

*Zahvaljujem se svim kolegama sa Instituta za medicinska istraživanja, Instituta za onkologiju i radiologiju i Farmaceutskog fakulteta na podršci.*

*Posebno se zahvaljujem mojim roditeljima za veru u mene i konstantnu podršku koja mi je uvek jako puno značila.*

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, Milošu i mom sinu Aleksi na ljubavi, podršci i razumevanju.*

# Uticaj biljnih polifenola na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa ćelijama endotela, krvnim i malignim ćelijama

## REZIME

Trombociti imaju važnu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih i malignih bolesti. Uticaj biološki aktivnih sastojaka namirnica na aktivaciju trombocita i njihovu heterotipsku agregaciju predstavlja jedan od potencijalnih mehanizama njihove uloge u prevenciji hroničnih bolesti i promociji zdravlja. Rezultati interventnih dijetarnih studija potvrđuju uticaj polifenola na funkciju trombocita. Protočna citometrija predstavlja jednu od najoptimalnijih metoda ispitivanja uticaja dijetarnih sastojaka na trombocite.

Osnovni cilj doktorske disertacije je ispitivanje uticaja biljaka koje sadrže polifenole na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa leukocitima, u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, kao i nakon konzumacije namirnica biljnog porekla, koje predstavljaju dijetarni izvor polifenola.

Primenom protočne citometrije pokazano je da u *in vitro* eksperimentalnim uslovima svi ispitivani ekstrakti (ekstrakt koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke i aronije) pokazuju efekte su na neki od analiziranih parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa monocitima i neutrofilima, kod zdravih ispitanika ili ispitanika sa metaboličkim sindromom. Na najveći broj parametara delovali su ekstrakti kelja i mirođije, a u tom smislu najmanje izraženo delovanje pokazao je ekstrakt nara.

Ispitivanjem delovanja metabolita pokazano je da svi ispitivani metaboliti: kvercetin-3-glukuronid, 3'-metil-kvercetin-3-glukuronid, kvercetin-3'-sulfat i sulforafan-cistein-glicin pokazuju efekte na neki od parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa monocitima i neutrofilima, kod zdravih ispitanika ili ispitanika sa metaboličkim sindromom. Sulforafan-cistein-glicin delovao je na veći broj parametara u odnosu na metabolite kvercetina. Delovanje 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida bilo je izraženije u odnosu na delovanje ostalih metabolita kvercetina.

Nakon ispitivanja delovanja jednokratne konzumacije namirnica koje predstavljaju dijetarni izvor polifenola pokazano je da konzumacija soka od aronije kod zdravih ispitanika dovodi do smanjenja aktivacije trombocita i to smanjenjem procenta P-selektin-pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima, kao i smanjenjem procenta i gustine ovog adhezionog receptora nakon *ex vivo* delovanja adenozin-difosfata i

arahidonske kiseline kao agonista. Uticaj na aktivaciju praćen je i smanjenjem procenta agregata trombocita i monocita i agregata trombocita i neutrofila u svim ispitivanim eksperimentalnim uslovima. Konzumacija soka od aronije dovela je i do smanjenja adhezije trombocita za EA.hy 926 ćelije.

Konzumacija čaja od koprive, čaja od mirođije i šarplaninskog čaja uticala je na ekspresiju pojedinih markera aktivacije, ali ne i na agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima. Poređenjem delovanja jednokratne konzumacije ovih čajeva pokazano je da je konzumacija čaja od mirođije dovela je do promene najvećeg broja parametara aktivacije trombocita.

Uticaj jednokratne konzumacije soka od nara na aktivaciju trombocita i njihovu heterotipsku agregaciju pokazan je smanjenjem procenta P-selektin-pozitivnih trombocita i gustine P-selektina nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata kao agonista i njihove agregacije sa monocitima u istim eksperimentalnim uslovima. Konzumacija ovog soka nije uticala na ekspresiju GPIIb-IIIa na trombocitima i procenat agregata trombocita i neutrofila.

Ekstrakti koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke, pored antioksidativne aktivnosti određene hemijskim metodama, pokazuju i antioksidativno delovanje primenom ćelijskih modela, smanjujući nivo reaktivnih vrsta kiseonika u eritrocitima izloženim delovanju vodonik peroksida i trombocitima izloženim delovanju adenzin-difosfata. Delovanjem na trombocite, ispitivani ekstrakti dovode i do smanjenja agregacije trombocita sa HeLa ćelijama, porekla iz malignog karcinoma grlića materice.

Rezultati dobijeni u okviru ovog istraživanja ukazuju na potencijalno delovanje ispitivanih namirnica u prevenciji nepovoljnih uticaja faktora sredine na trombocite, uključujući i uticaj neodgovarajuće dijetete i nepravilnog režima ishrane. Shodno tome, ispitivane namirnice, kao sastavni deo optimalne dijetete, imaju značajnu ulogu u očuvanju kardiovaskularnog zdravlja.

**Ključne reči:** polifenoli; trombociti; protočna citometrija; aktivacija; agregacija;

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Hemija hrane i dijetetskih proizvoda

**UDK broj:** 612.392.7 : 547.56 : 611.018.52 (043.3)

# The impact of plant polyphenols on platelet activation and their aggregation with endothelial, blood and malignant cells

## SUMMARY

Platelets have an important role in the pathogenesis of the cardiovascular and malignant diseases. The impact of bioactive dietary compounds on platelet activation and their aggregation with leukocytes is one of the potential mechanisms of their role in health promotion and the prevention of chronic diseases. The results of dietary intervention studies confirm the effect of polyphenols on platelet function. Flow cytometry is considered to be one of the most advantageous methods in investigation of dietary compounds effects on platelets.

The main aim of this study was the evaluation of potential effects of polyphenol-rich plants on platelets activation and their aggregation with leukocytes, in *in vitro* experimental setting and after the consumption of plant foods, as dietary sources of polyphenols.

All investigated plant extracts (extracts of nettle, dill, mountain tea, kale, pomegranate, persimmon and chokeberry) affected some of the analyzed parameters of platelets activation and their aggregation with monocytes and neutrophils, in healthy subjects or subjects with metabolic syndrome. The most effective were kale and dill extracts, influencing most of the parameters evaluated by flow cytometry, while the least effective was pomegranate extract.

All investigated metabolites: quercetin-3-glucuronide, 3'-methyl-quercetin-3-glucuronide, quercetin-3'-sulfate and sulforaphane-cysteine-glycine have shown the effects on some parameters of platelet activation and their aggregation with monocytes and neutrophils, in healthy subjects or subjects with metabolic syndrome. The most effective was sulforaphane-cysteine-glycine, influencing most of the analyzed parameters. 3'-methyl-quercetin-3-glucuronide showed more pronounced effects compared to the effects of other metabolites of quercetin.

Dietary intervention studies investigating the effects of single consumption of plant-based foods as dietary sources of polyphenols have shown that consumption of chokeberry juice beneficially influenced platelet activation status by reducing the percentage of P-selectin-positive platelets under basal conditions, as well as reducing

the percentage and density of P-selectin after *ex vivo* agonistic action of adenosine diphosphate and arachidonic acid. The impact on activation is accompanied by the reduction of percentage of platelets-monocytes aggregates and platelet-neutrophils aggregates, in all experimental conditions. Consumption of chokeberry juice also reduced the adhesion of isolated platelets to EA.hy 926 cells.

The consumption of nettle, dill and mountain-tea infusions affected the expression of specific markers of activation, but not the aggregation of platelets to monocytes and platelet to neutrophils. The most effective, compared to other infusions, was the infusion of dill, influencing the most of the analyzed parameters of platelet activation, evaluated by flow cytometry.

The consumption of pomegranate juice influenced platelet activation by reducing the percentage of P-selectin-positive platelets and the density of P-selectin, after *ex vivo* action of suboptimal and optimal concentrations of adenosine diphosphate as agonists. The effects were accompanied with the decrease in platelet-monocyte aggregates in the experimental conditions. Pomegranate juice did not show an effect on GPIIb-IIIa expression and platelet-neutrophil aggregation.

The antioxidant activity of nettle, dill, mountain tea, kale, pomegranate, persimmon and chokeberry extracts have been shown by using chemical and cell-based models. Cellular antioxidant protection was shown by reducing the level of reactive oxygen species in erythrocytes exposed to hydrogen peroxide and in platelets exposed to adenosine diphosphate. Investigated extracts also reduced platelet aggregation with human cervix carcinoma HeLa cells, by their action specifically targeted to platelets.

The results obtained in this study indicate the potential role of investigated foods in modulation of adverse effects of environmental factors on platelets, including the impact of dietary factors and inadequate dietary regimens. In conclusion, as a part of optimal diet, these foods have an important role in maintaining cardiovascular health.

**Keywords:** polyphenols; platelets; flow cytometry; activation; aggregation;

**Scientific field:** Pharmacy

**Scientific discipline :** Chemistry of Food and Dietetic Products

**UDK number:** 612.392.7 : 547.56 : 611.018.52 (043.3)



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. TROMBOCITI.....	1
1.1.1. Struktura trombocita.....	1
1.1.2. Uloga trombocita u patogenezi kardiovaskularnih bolesti.....	6
1.1.3. Uloga trombocita u patogenezi malignih bolesti.....	9
1.1.4. Uticaj dijetarnih faktora na funkciju trombocita.....	10
1.1.5. Metode ispitivanja funkcije trombocita.....	10
1.2. POLIFENOLI.....	14
1.2.1. Polifenoli kao nenutritivni sastojci namirnica.....	14
1.2.2. Metabolizam polifenola.....	16
1.2.3. Polifenoli u prevenciji kardiovaskularnih i malignih bolesti.....	18
1.3. UTICAJ POLIFENOLA NA FUNKCIJU TROMBOCITA.....	19
1.4. TRADICIONALNE NAMIRNICE KAO IZVOR POLIFENOLA.....	22
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	25
3. MATERIJAL I METODE.....	27
3.1. MATERIJAL.....	27
3.1.1. Hemikalije, podloge, antitela i rastvori.....	27
3.1.2. Ispitivani uzorci.....	31
3.1.2.1. Biljni materijal.....	32
3.1.2.2. Izrada sokova.....	33
3.1.2.3. Izrada suvih ekstrakata.....	33
3.1.2.4. Namirnice korišćene u dijetarnim interventnim studijama.....	34
3.1.3. Čelijske linije.....	35
3.1.4. Izolovane krvne ćelije.....	35

## 3.2. METODE

3.2.1. Određivanje ukupnih fenola.....	36
3.2.2. Određivanje ukupnih antocijana.....	36
3.2.3. Određivanje rastvorljive suve materije, ukupne kiselosti i pH vrednosti.....	36
3.2.4. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti.....	37
3.2.5. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti.....	37
3.2.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti na ćelijama u <i>in vitro</i> eksperimentalnim uslovima.....	38
3.2.7. Određivanje parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa monocitima i neutrofilima primenom protočne citometrije.....	39
3.2.7.1. Uzorkovanje krvi.....	39
3.2.7.2. Određivanje parametara aktivacije trombocita.....	39
3.2.7.3. Određivanje parametara agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima.....	44
3.2.8. Određivanje adhezije trombocita i endotelnih ćelija u kulturi.....	47
3.2.9. Određivanje agregacije trombocita i malignih ćelija u kulturi.....	48
3.2.10. Određivanje biohemijskih parametara i krvne slike.....	48
3.2.11. Određivanje antropometrijskih parametara i vrednosti krvnog pritiska.....	48
3.2.12. Statistička obrada podataka.....	49

## 3.3. DIZAJN DIJETARNIH INTERVENTNIH STUDIJA

3.3.1. Ispitivanje delovanja jednokratne konzumacije soka od aronije na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima.....	50
3.3.1.1. Ispitanici.....	50
3.3.1.2. Protokol.....	50
3.3.2. Ispitivanje delovanja jednokratne konzumacije čaja od koprive, čaja od mirođije i šarplaninskog čaja na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima.....	51
3.3.2.1. Ispitanici.....	51
3.3.2.2. Protokol.....	52
3.3.3. Ispitivanje delovanja jednokratne konzumacije soka od nara na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima.....	53
3.3.3.1. Ispitanici.....	53
3.3.3.2. Protokol.....	53

4. REZULTATI .....	55
4.1. HEMIJSKA ISPITIVANJA .....	55
4.1.1. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim suvim ekstraktima biljaka, sokovima i čajevima .....	55
4.1.2. Sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima aronije i nara i ispitivanim sokovima od voća .....	57
4.1.3. Rastvorljiva suva materija, ukupna kiselost i pH vrednost sokova .....	59
4.1.4. Anti-radikalska aktivnost ispitivanih suvih ekstrakata, čajeva i sokova .....	60
4.2. UTICAJ ISPITIVANIH EKSTRAKATA I METABOLITA NA AKTIVACIJU TROMBOCITA I NJIHOVU AGREGACIJU SA MONOCITIMA I NEUTROFILIMA U <i>IN VITRO</i> EKSPERIMENTALNIM USLOVIMA .....	62
4.2.1. Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja kelja, nara, japanske jabuke i aronije na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima .....	62
4.2.2. Uticaj kvercetin-3-glukuronida, 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida, kvercetin-3'-sulfata, sulforafan-cistein-glicina i protokatehnične kiseline na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima .....	68
4.3. UTICAJ JEDNOKRATNE KONZUMACIJE NAMIRNICA KOJE SADRŽE POLIFENOLE NA AKTIVACIJU TROMBOCITA I NJIHOVU AGREGACIJU SA MONOCITIMA I NEUTROFILIMA .....	72
4.3.1. Uticaj jednokratne konzumacije soka od aronije na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima .....	72
4.3.2. Uticaj jednokratne konzumacije čaja od koprive, čaja od mirođije i šarplaninskog čaja na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima .....	80
4.3.3. Uticaj jednokratne konzumacije soka od nara na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima .....	89
4.4. UTICAJ ISPITIVANIH BILJNIH EKSTRAKATA NA NIVO REAKTIVNIH VRSTA KISEONIKA U KRVNIM ČELIJAMA IZLOŽENIM DELOVANJU PROOKSIDANASA ILI AGONISTA .....	97
4.4.1. Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, nara, kelja, japanske jabuke i aronije na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u eritrocitima izloženim delovanju vodonik-peroksida .....	97

---

4.4.2 Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, nara, kelja, japanske jabuke i aronije na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima izloženim delovanju adenozin-difosfata .....	101
<b>4.5. UTICAJ BILJNIH POLIFENOLA NA INTERAKCIJU TROMBOCITA SA ENDOTELNIM I MALIGNIM ĆELIJAMA.....</b>	<b>103</b>
4.5.1. Uticaj konzumacije soka od aronije na adheziju trombocita za EA.hy 929 ćelije .....	103
4.5.2. Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke na interakciju trombocita sa HeLa ćelijama.....	104
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>108</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>126</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>130</b>

## 1.1. TROMBOCITI

Trombociti su krvne ćelije bez jedra i formiraju se u koštanoj srži iz megakariocita. Predstavljaju najmanje krvne ćelije, diskoidnog oblika i prečnika 2-5  $\mu\text{m}$ . Prosečan životni vek trombocita u cirkulaciji je 7-10 dana, a njihov optimalan broj iznosi 150 - 450 x 10<sup>9</sup>/L krvi (1, 2).

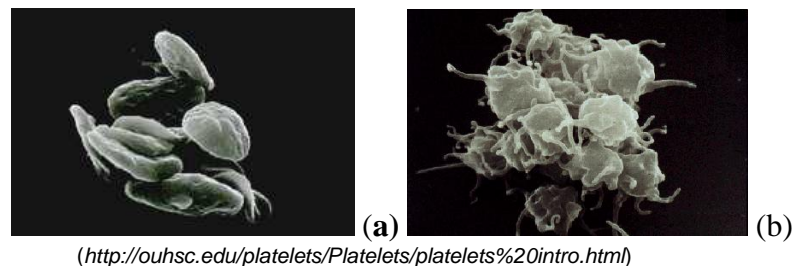
U fiziološkim uslovima trombociti imaju ključnu ulogu u jednom od najznačajnijih homeostatskih mehanizama – hemostazi, procesu zaustavljanja krvarenja nakon oštećenja zida krvnog suda i narušavanja njegovog integriteta. Hemostatski proces se zasniva na adheziji trombocita za molekule subendotelnog ekstraćelijskog matriksa oštećenog krvnog suda, njihovoj aktivaciji, formiranju agregata trombocita i trombocitnog čepa. U patološkim stanjima, povećana aktivacija trombocita i sklonost ka agregaciji ima važnu ulogu u etiologiji i patogenezi koronarnih, perifernih i cerebralnih vaskularnih bolesti. Interakcija hiperaktivnih trombocita sa ćelijama endotela krvnih sudova i drugim trombocitima može dovesti do formiranja arterijskih trombova (3). Poremećaj funkcije trombocita takođe doprinosi etiopatogenezi ateroskleroze i predloženi mehanizmi uključuju interakciju aktiviranih trombocita sa ćelijama endotela, granulocitima, monocitima i makrofagama (4), kao i efekte posredovane trombocitnim hemokinima, proinflamatornim faktorima i mikropartikulama (5).

Pored uloge u etiopatogenezi kardiovaskularnih bolesti, najnovija istraživanja ukazuju i na značajnu ulogu trombocita u nastanku i razvoju malignih bolesti (6), hroničnih zapaljenskih bolesti (7), u funkciji imunskog sistema (8), kao i povezanost sa pojedinim neuro-degenerativnim (9) i psihijatrijskim bolestima (10).

### 1.1.1 Struktura trombocita

Funkcija trombocita u fiziološkim uslovima i patološkim stanjima zasniva se na njihovim specifičnim morfološkim karakteristikama. Kada napuste kostnu srž i dospeju u cirkulaciju, trombociti cirkulišu u sloju najbližem površini krvnog suda. Ovakvo kretanje unutar lumena, kao posledica malih dimenzija ćelija, njihovog specifičnog oblika, kao i hemodinamskih i reoloških karakteristika krvi ključno je za proces hemostaze. Ukoliko u cirkulaciji ne dođu u kontakt sa bilo kojim od fizioloških

agonista, trombociti završavaju svoj životni vek u neaktiviranom obliku, dospevajući do ćelija retikularno-endotelijalnog sistema (11). U suprotnom, kao odgovor na promenjene uslove sredine kojima su izloženi, trombociti odgovaraju kompleksnim mehanizmima koji rezultuju i nizom fenotipskih promena. Osnovne promene u strukturi, do kojih dolazi nakon aktivacije i na osnovu kojih se aktivirani trombociti diferenciraju u odnosu na neaktivirane, „mirujuće“ trombocite su promena oblika, odnosno formiranje višestrukih pseudopoda (Slika 1) i ekspresija specifičnih receptora na površini.



(<http://ouhsc.edu/platelets/Platelets/platelets%20intro.html>)

**Slika 1.** Neaktivirani trombociti glatke površine i diskoidnog oblika (a) i aktivirani trombociti nepravilnog oblika sa velikim brojem pseudopoda (b)

S obzirom da ne poseduju jedro i nisu u stanju da se adaptiraju na izmenjene uslove sredine *de novo* sintezom proteina, trombociti sadrže veliki broj pre-sintetisanih molekula i struktura, raspoloživih da se ispolje i ostvare svoje funkcije kao odgovor na određene patološke promene u organizmu.

Osnovnu strukturu trombocita čine tri zone: periferna zona, „sol-gel“ zona i zona organela (12).

Perifernu zonu čine plazma membrana, sastavljena od spoljašnjeg omotača – glikokaliksa i unutrašnjeg lipidnog dvosloja, i sub-membranski sloj, u kome su smešteni kontraktilni filamenti. Važnu karakteristiku strukture trombocita predstavljaju brojna cevasta udubljenja na površini, invaginacije plazma membrane, koje čine takozvani "kanalikularni sistem povezan sa površinom" (eng. *surface-connected canalicular system* - *SCCS*). Ovaj sistem predstavlja "rezervnu" raspoloživu membranu trombocita, specifične građe i funkcije, neophodnu za promenu oblika i ekspresiju specifičnih površinskih molekula nakon aktivacije. Na površini glikokaliksa nalaze se receptori za različite fiziološke agoniste trombocita: adenzin difosfat (ADP), trombin, von Willebrand-ov faktor (vWF), kolagen, fibrinogen, fibrin, fibronektin, epinefrin, trombocitni aktivacioni faktor (eng. *platelet activating factor* – *PFA*), trombospondin (TSP), tromboksan A2 (TxA2), epinefrin, serotonin i glikozil-transferazu. U nivou

submembranskog sloja citoplazmatski domeni ovih receptora stupaju u interakciju sa proteinima uključenim u prenošenje signala tokom procesa aktivacije trombocita i kontraktilnim proteinima citoskeleta koji učestvuju u translokaciji pojedinih receptorskih kompleksa iz unutrašnjosti na površinu trombocita, nakon aktivacije. Periferna zona ima ključnu ulogu u procesu adhezije, aktivacije i agregacije, jer predstavlja mesto prvog kontakta trombocita sa spoljašnjom sredinom i potencijalnim aktivacionim stimulusima (12).

U „sol–gel“ zoni ispresecanoj kanalima SCCS koji se prostiru sa površine, nalaze se mikrotubule i mikrofilamenti, kao deo citoskeleta i kontraktilni aparat trombocita, uključeni u proces promene oblika prilikom aktivacije i kontrakciji trombocita prilikom formiranja trombocitnog čepa (12).

U zoni organela se, pored mitohondrija i lizozoma, nalaze i specifične organele trombocita:  $\alpha$ -granule i „guste“ granule, u kojima su smešteni molekuli od ključnog značaja za funkciju trombocita u fiziološkim i patološkim stanjima. Najbrojnije organele u trombocitima (40-80 po trombocitu) su  $\alpha$ -granule u kojima su smešteni adhezivni proteini: P-selektin, vWF, TSP, fibrinogen, integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3; trombocitni hemokini: trombocitni faktor 4 (eng. *platelet factor 4 –PF 4*), makrofagni inflamatorni protein 1  $\alpha$  (eng. *macrophage inflammatory protein 1  $\alpha$  –MIP-1  $\alpha$* ), RANTES molekuli (eng. „*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*“), monocitni hemotaktični protein 3 (eng. *monocyte chemotactic protein 3, MCP-3*) i interleukin 8; faktori koagulacije V i VIII; faktori fibrinolitičkog puta: plazminogen i inhibitor aktivatora plazminogena (eng. *plasminogen activator inhibitor 1, PAI-1*) kao i faktori rasta i angiogeneze: trombocitni faktor rasta (eng. *platelet-derived growth factor - PDGF*), transformišući faktor rasta  $\beta$  (eng. *transforming growth factor  $\beta$ - TGF $\beta$* ); epidermalni faktor rasta, faktor rasta hepatocita, insulinu-sličan faktor rasta-1, faktori rasta vaskularnog endotela A i C (eng. *vascular endothelial growth factor, VEGF*). Nakon aktivacije trombocita dolazi do fuzije prethodno odvojenih  $\alpha$ -granula i oslobađanja njihovog sadržaja preko kanala SCCS, na površinu trombocita i u cirkulaciju. U „gustim“ granulama smešteni su: adenzin-difosfat (eng. *adenosin diphosphate – ADP*), autokrini agonisti trombocitnih receptora; joni kalcijuma i magnezijuma ( $\text{Ca}^{2+}$ ), drugi nukleotidi i serotonin (12, 13).

Interakcija trombocita i spoljašnje sredine ostvaruje se posredstvom velikog broja receptora. Receptori prisutni na površini trombocita razlikuju se po strukturi,

funkciji, broju, po tome da li su prisutni na površini „mirujućih“ trombocita ili se ekspimiraju kao odgovor na aktivaciju i funkcionišu kao adhezioni molekuli (14).

Transmembranski receptori za fiziološke agoniste prisutni su na površini „mirujućih“ trombocita. Najveći broj ovih receptora pripada familiji G-protein kuplovanih receptora (eng. *G-protein coupled receptors- GPCR*) uključujući receptore koji vezuju trombin (PAR1, PAR2, PAR4), ADP (P2Y<sub>1</sub> i P2Y<sub>12</sub>), prostaglandine (receptor za TXA<sub>2</sub> i PGE<sub>2</sub>), lipide (receptori za PAF i lizo-fosfatidnu kiselinu), hemokine, vazopresin, epinefrin (β<sub>2</sub>-adrenergički receptor), serotonin (5-HT<sub>2A</sub>). Posebnu važnost imaju receptori za trombin, s obzirom na ključnu ulogu trombina u hemostazi, i ADP, s obzirom na prisustvo ovog molekula u „gustim“ granulama trombocita i autokrinog agonističkog delovanja. Autokrino delovanje ima i tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>). U inhibitorne receptore GPCR familije spadaju receptori za prostaglandin I<sub>2</sub> (prostaciklin) (14).

Familiji receptora sa domenima bogatim leucinom (eng. *leucine rich repeat - LRR*) pripada receptorski kompleks GPIb/IX/V. U uslovima povećanog napona smicanja (eng. *shear stress*), kome su izloženi trombociti, ostale krvne ćelije i ćelije endotela usled proticanja krvi kroz smanjen volumen krvnog suda ili turbulencije izazvane promenama strukture zida krvnog suda (15), ovaj receptorski kompleks predstavlja osnovni receptor trombocita za vWF. Istovremeno, GPIb/IX/V receptorski kompleks stupa u interakciju sa TSP, αMβ<sub>2</sub> integrinima na površini leukocita i P-selektinom na površini aktiviranih endotelih ćelija i trombocita, učestvuje u aktivaciji GPIIb-IIIa receptora i prokoagulatornoj funkciji trombocita vezivanjem trombina i pojedinih faktora koagulacije, kao i u regulaciji oblika i veličine trombocita i uklanjanju trombocita iz cirkulacije ćelijama retikularno-endotelijalnog sistema (16).

Familiji integrina pripada glikoprotein α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> (GP Ia-IIb na trombocitima, VLA<sub>2</sub> na leukocitima), koji predstavlja receptor trombocita za kolagen (14). U indirektno receptore za kolagen spadaju GPVI, koji pripada superfamiliji imunoglobulina i čije je vezivanje zavisno od vezivanja kolagena za GPIa-IIb, i GPIb/IX/V za čiju se GPV jedinicu vezuje kolagen samo ukoliko je za Ibβ jedinicu vezan vWF.

Nakon niza signalnih događaja prouzrokovanih delovanjem agonista i njihovom interakcijom sa odgovarajućim receptorima, na površini aktiviranih trombocita dolazi do ekspimiranja receptora koji imaju direktnu ulogu u hemostatskom procesu, kao odgovoru trombocita na agoniste. Oni mogu biti rezultat konformacionih promena



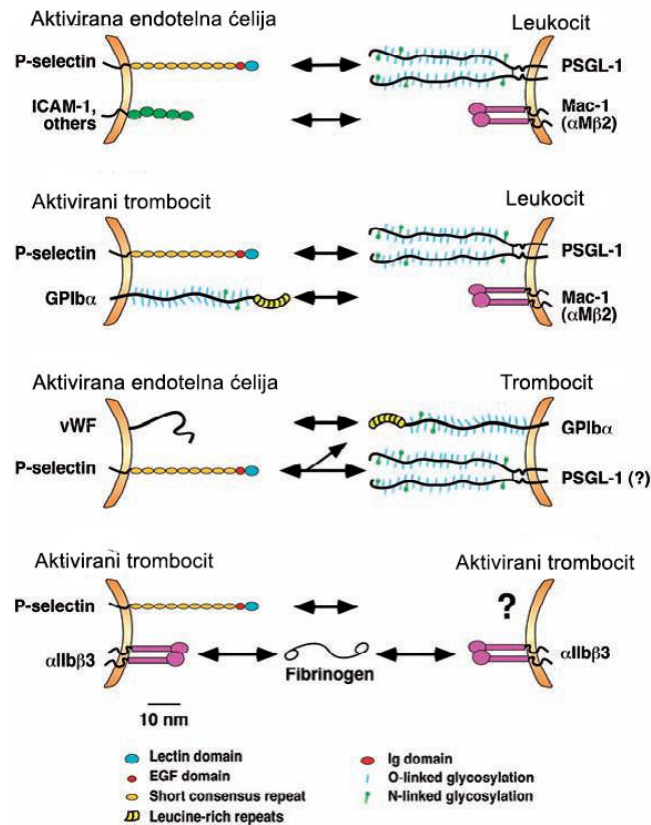
receptorskih kompleksa već prisutnih na površini neaktiviranih trombocita (GPIIb-IIIa) ili predstavljaju glikoproteine prisutne u granulama neaktiviranih trombocita koji će se naći na površini nakon aktivacije (P-selektin). S obzirom da se nalaze isključivo na površini aktiviranih trombocita, ovi receptori se koriste kao markeri njihove aktivacije.

**Glikoprotein  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 (GPIIb-IIIa kompleks)** pripada porodici integrina i karakterističan je isključivo za trombocite. Na jednoj ćeliji se u proseku nalazi 50000-80000 kopija ovog glikoproteina. S obzirom da je prisutan jedino na površini trombocita i megakariocita, i  $\alpha$ IIB subjedinica (CD41) i  $\beta$ 3 subjedinica (CD61) ovog integrina koriste se kao pan-trombocitni markeri tj. u analizi ćelija periferne krvi, trombociti se diferenciraju u odnosu na ostale populacije ćelija na osnovu njihovog prisustva na površini. Intergin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 ima funkciju receptora. Na "mirujućim" trombocitima integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 nalazi se u neaktivnom obliku. Aktivacijom trombocita različitim agonistima (trombin, ADP, kolagen, vWF, TxA<sub>2</sub>) dolazi do niza signalnih događaja koji dovode do konformacionih promena u  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 kompleksu i on prelazi u aktivno stanje, stanje povećanog afiniteta i aviditeta za ligande. Ključna uloga aktivnog oblika GPIIb-IIIa receptora je uloga u agregaciji trombocita vezivanjem za osnovne ekstraćelijske ligande, fibrinogen i vWF. Vezivanjem jednog molekula liganda za receptore na površini dva trombocita, formiraju se unakrsne veze i propagira agreagacija trombocita. Prepoznavanje vitronektina, fibronektina i trombospondina kao liganda od strane GPIIb-IIIa ima dodatnu ulogu u adheziji trombocita za subendotelijalni matriks i njihovoj agregaciji (17).

**P-selektin** je glikoprotein konstitutivno prisutan u  $\alpha$ -granulama trombocita. Nakon stimulacije trombocita agonistima, P-selektin se oslobađa iz ovih granula i putem sistema kanala SCCS dospeva na površinu trombocita i eksprimiran na površini ima funkciju receptora. Osnovni ligand P-selektina je PSGL-1 (od eng. *P-selectin glycoprotein ligand*) prisutan na površini svih leukocita. Aktivna uloga P-selektina u patogenezi tromboze, u koagulaciji i ključna uloga u patogenezi ateroskleroze zasniva se pre svega na učešću u regrutovanju leukocita, pre svega monocita, u okviru inflamatorne komponente aterosklerotskog procesa i posredovana je interakcijom između P-selektina i molekula PSGL-1. Studije na animalnim modelima pokazale su da inhibicija formiranja P-selektin/PSGL-1 kompleksa pospešuje endogenu fibrinolizu i arterijsku trombolizu, kao i da smanjuje intenzitet procesa uključениh u razvoj aterosklerotskih promena na krvnim sudovima, uključujući proliferaciju glatkih

mišićnih ćelija, aktivaciju makrofaga, akumulaciju estara holesterola u makrofagama i formiranje aterosklerotskog plaka (18).

Učešće pojedinih receptora na površini aktiviranih trombocita, aktiviranih endotelnih ćelija i leukocita u njihovoj međusobnoj interakciji prikazano je na Slici 2.



Slika 2. Interakcija između trombocita, leukocita i endotelnih ćelija [preuzeto i modificirano iz McEver, 2007(19) ]

### 1.1.2 Uloga trombocita u patogenezi kardiovaskularnih bolesti

Kardiovaskularne bolesti predstavljaju bolesti koje zahvataju srce i krvne sudove i prema lokalizaciji mogu se podeliti na bolesti srca, cerebro-vaskularne bolesti i bolesti perifernih krvnih sudova. Na osnovu podataka Svetske zdravstvene organizacije kardiovaskularne bolesti (KVB) predstavljaju najčešći uzrok morbiditeta i mortaliteta u svetu. Prema najnovijim statističkim podacima u Evropi je čak 46% smrtnih slučajeva posledica KVB.

Osnovni uzročnici kardiovaskularnih bolesti su ateroskleroza i tromboza. Uloga trombocita u etiopatogenezi ateroskleroze i tromboze zasniva se na interakciji aktiviranih trombocita sa drugim trombocitima, ćelijama endotela, granulocitima,

monocitima i makrofagama, kao i delovanju trombocitnih hemokina, proinflamatornih faktora i mikropartikula, koji se oslobađaju nakon aktivacije (5).

U inicijalnoj interakciji trombocita sa endotelnim ćelijama ključnu ulogu ima P-selektin, mada se čvrsta veza između endotelnih ćelija i trombocita, pokazana u *in vitro* uslovima, uspostavlja preko GPIIb-IIIa. Postoji više potencijalnih mehanizama kojima se ostvaruje uticaj interakcije trombocita i endotelnih ćelija u nastanku i razvoju ateroskleroze. Najverovatnije je da sloj trombocita, koji se formira na mestu oštećenog krvnog suda, ili sporadično vezani trombociti, dovode do regrutovanja leukocita posredstvom trombocitnih citokina (5, 20).

Interakcija trombocita i leukocita ostvaruje se preko P-selektina trombocita i PSGL-1 receptora na leukocitima. Dodatno je moguće indirektno vezivanje GPIIb-IIIa receptora za integrine leukocita, preko proteina plazme. Monociti, kao jedna od populacija leukocita, imaju kompetitivnu prednost u odnosu na ostale populacije, mada molekularne osnove još uvek nisu poznate (21). Životni vek nastalih agregata monocita i trombocita je ograničen i brojni eksperimenti pokazali su da on u proseku iznosi 2-3 h, koliko je i životni vek P-selektina na površini aktiviranih trombocita. Najverovatnije sa "otpadanjem" P-selektina sa površine trombocita dolazi i do odvajanja nastalih agregata. Međutim, vezivanjem za monocite trombociti prouzrokuju niz promena u ovim ćelijama koje utiču na ulogu monocita u procesu ateroskleroze. Vezivanjem trombocita za leukocite dolazi do aktivacije integrina Mac-1 i VLA-1 na leukocitima, povećanja afiniteta i aviditeta PSGL-1, do oksidativnog stresa u monocitima koji deluje stimulatивно na "regrutovanje" monocita. Prisustvo P-selektina ili izlaganje delovanju trombocitnih citokina, u monocitima dovodi do stimulacije ekspresije faktora nekroze tumora (TNF  $\alpha$ ), interleukina-8, MCP-1. Sve ovo doprinosi razvoju inflamatornih i prokoagulatornih procesa uključenih u patogenezu kardiovaskularnih bolesti (5, 22). Najznačajnija uloga trombocita u patogenezi ateroskleroze zasniva se na njihovom vezivanju za monocite.

Uloga trombocitnih hemokina u aterosklerozi i vaskularnom remodelovanju je višestruka. Najzastupljeniji protein  $\alpha$ -granula trombocita, PF 4, ima hemotaktično delovanje na monocite i druge leukocite i stimuliše vezivanje oksidovanog LDL-a za endotelne i glatke mišićne ćelije krvnog suda. RANTES molekul i MIP-1 snažni su hemoatraktanti T-limfocita i monocita. Osnovni faktor rasta trombocita, PDGF, pored hemotaktičnog delovanja na monocite, stimuliše migraciju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija zida krvnog suda (23). Važnu ulogu ima i ligand za CD40 receptor

(CD40L), koji je takođe prisutan u granulama trombocita. Njegova sekrecija, nakon aktivacije trombocita, indukuje niz inflamatornih reakcija u endotelnim ćelijama uključujući produkciju reaktivnih vrsta kiseonika i ekspresiju adhezionih molekula (VCAM-1, ICAM-1, E-selektin), hemokina (MCP-1 i IL-8) i citokina (IL-6), koji učestvuju u regrutovanju leukocita. Vezivanje CD40 L za CD40 receptor na površini makrofaga, endotelnih i glatkih mišićnih ćelija krvnog suda inicira i ekspresiju matriksnih metalo-proteinaza, koje takođe učestvuju u procesu aterogeneze (24).

Na osnovu definicije Američke asocijacije za srce (eng. *American Heart Association - AHA*) faktori rizika za nastanak bolesti, uključujući i KVB, predstavljaju “merljive biološke karakteristike individue koje prethode dobro definisanom ishodu te bolesti (npr. infarktu miokarda), predviđaju taj ishod i nalaze se na direktnom biološkom uzročnom putu tog ishoda”. Za razliku od faktora rizika, AHA definiše biomarker kao „biološki indikator procesa uključenih u razvoj određene bolesti koji mogu, ili ne, biti uzrok nastanka te bolesti” (25). Osnovni cilj definisanja faktora rizika u odnosu na biomarkere je identifikovanje pojedinaca sa povećanim rizikom kao ciljne grupe primene preventivnih mera u oblasti javnog zdravlja.

Nezavisni faktori rizika za nastanak KVB obuhvataju faktore podložne promenama: pušenje, hipertenziju, dislipidemiju, gojaznost, hiperglikemiju, fizičku neaktivnost, neadekvatnu ishranu i nepromenljive: starost, pol i porodičnu anamnezu KVB (26). Pored navedenih „tradicionalnih“ faktora rizika, u nove, „netradicionalne“ faktore rizika spadaju povišen nivo C-reaktivnog proteina, triglicerida, interleukina-6, fibrinogena, homocisteina (25).

Povećan procenat aktiviranih trombocita prisutan je kod pacijenata sa hiperholesterolemijom (27), hipertenzijom (28), kod pušača (29), pacijenata sa šećernom bolešću (30) i metaboličkim sindromom (31). Pored povećanog broja aktiviranih trombocita, prisustvo pojedinih faktora rizika KVB povezano je i sa hiper-reaktivnošću trombocita, odnosno povećanom aktivacijom trombocita pri delovanju niskih koncentracije agonista, u odnosu na aktivaciju kod zdravih osoba. Pokazano je da hiper-reaktivnost trombocita, odnosno povećana ekspresija P-selektina pri delovanju niskih, suboptimalnih koncentracija ADP, direktno koreliše sa incidencom akutnih kardiovaskularnih događaja, infarkta i šloga, kod pacijenata sa koronarnom arterijskom bolešću, ali i pacijenata sa dijabetesom tip II (32). Na osnovu predloženog, poremećaj funkcije trombocita ne smatra se isključivo biomarkerom akutnih kardiovaskularnih bolesti, već predstavlja i biomarker rizika za nastanak i razvoj ateroskleroze i KVB, na

osnovu čega se racionalizuje potreba za evaluacijom antitrombocitnih agenasa u primarnoj, sekundarnoj i tercijarnoj prevenciji ovih bolesti.

### **1.1.3. Uloga trombocita u patogenezi malignih bolesti**

Na osnovu epidemioloških studija i brojnih eksperimenata u *in vitro* uslovima i na animalnim modelima, pokazano je da trombociti imaju veliki značaj u patogenezi i progresiji malignih bolesti. Interakcija trombocita i malignih ćelija značajno doprinosi i razvoju malignog procesa i stanjima povećane aktivacije trombocita, hiperkoagulacije i trombocitopenije, kao čestih pratećih simptoma malignih bolesti.

Aktivacija trombocita, prisutna kod malignih bolesti, posredovana je trombinom koji oslobađaju maligne ćelije, ADP-om porekla iz malignih ćelija ili trombocita, i tromboksanom A<sub>2</sub> iz trombocita. Trombin, prisutan na površini aktiviranih trombocita, stimuliše direktnu agregaciju sa malignim ćelijama, koja zavisi od ekspresije GPIIb-IIIa i prisustva fibronektina i vWF. Sekvestracija trombocitima omogućava malignim ćelijama da izbegnu mehanizme imunološke kontrole tumorskog procesa i doprinosi njihovom metastatskom potencijalu. Aktivirani trombociti oslobađaju faktore rasta tumora (PDGF) i faktore angiogeneze (VEGF i angiopoetin-1). VEGF je najverovatnije odgovoran za povećanje permeabilnosti endotela i ekstravazaciju tumora. Ekstravazacija tumorskih ćelija i njihov metastatski potencijal direktno je srazmeran njihovoj sklonosti da vezuju trombocite, odnosno formiraju agregate. Vezivanje agregata tumorskih ćelija i endotelnih ćelija u inicijalnim fazama ovog procesa posredovano je P-selektinom (6, 33).

Značaj uloge trombocita u nastanku i progresiji malignog procesa potvrđen je i antitumorskim efektima trombinskih inhibitora i prostaciklina. Epidemiološke studije takođe pokazuju da acetil-salicilna kiselina smanjuje prevalencu više tipova kancera (34) i potencijalni mehanizmi pored inhibicije ciklooksigenaze, uključuju i direktno delovanje na metastatski proces (35), mada uticaj aspirina na preživljavanje pacijenata nije potvrđeno.

Najnovija saznanja o ulozi trombocita u nastanku i progresiji malignog procesa otvaraju novu oblast istraživanja antitumorskog delovanja sastojaka biljaka, usmerenog na funkciju trombocita (36).

#### **1.1.4. Uticaj dijetarnih faktora na funkciju trombocita**

Prisustvo faktora rizika za nastanak KVB povezanih sa ishranom i odgovarajućih biomarkera najčešće je posledica dugotrajnih nepravilnih obrazaca u ishrani, odnosno nepravilnog režima ishrane i neoptimalne, neizbalansirane dijeta (37, 38). Faktori rizika, pre svega, ukazuju na poremećaj u homeostazi brojnih biomolekula, činilaca faktora rizika, pri čemu dolazi do poremećaja njihovog statusa i ispoljavanja neželjenih efekata. Prisustvo ovih faktora povezano je i sa poremećajima u funkciji trombocita, najverovatnije kao posledica direktnog delovanja relevantnih biomolekula na trombocite. U eksperimentalnim uslovima pokazano je da do povećanja aktivacije i agregacije trombocita dolazi pri povećanju koncentracije glukoze (39), LDL i VLDL- holesterola (40), leptina (41), dok na smanjenje osetljivosti trombocita na delovanje agonista utiču insulin (42), HDL holesterol, hilomikroni (40) i azot-monoksid oslobođen iz endotela (43). S obzirom na direktno učešće trombocita u patogenezi KVB, dodatni značaj dijetarnih mera prevencije KVB smanjenjem faktora rizika je i smanjenje njima posredovanog delovanja na funkciju trombocita.

Pored faktora rizika za nastanak KVB, na aktivaciju trombocita i drugih ćelija uključenih u patogenezu KVB značajno utiče i postprandijalni status. Kao odgovor na postprandijalnu lipemiju dolazi do povećanja ekspresije P-selektina i GPIIb-IIIa, povećane agregacije trombocita i monocita i aktivacije monocita (44, 45) dok postprandijalna hiperglikemija povećava aktivaciju i reaktivnost trombocita (46, 47). Postprandijalni efekti na trombocite praćeni su disfunkcijom endotelnih ćelija, rezistentnom na akutno delovanje aspirina i osetljivom na delovanje azot-monoksida.

#### **1.1.5. Metode ispitivanja funkcije trombocita**

Postoji veliki broj laboratorijskih metoda koje se primenjuju u ispitivanju funkcije trombocita. One su deo laboratorijske dijagnostike određenih patoloških stanja povezanih sa njihovom funkcijom, ali se koriste i u okviru eksperimentalnih istraživanja.

Najčešće rutinski korišćen test u dijagnostici poremećaja vaskularne faze hemostaze je određivanje „vremena krvarenja“. Pored broja i funkcije trombocita, na „vreme krvarenja“ utiču i poremećaji u strukturi zida krvnih sudova, kao i u nivou vWF i fibrinogena u krvi, što onemogućava postojanje standardizovanih protokola i u savremenoj dijagnostici ovaj test ima istorijski značaj (48). U okviru rutinske hematološke dijagnostike se pored parametara ostalih krvnih ćelija, primenom

hematološkog brojača, određuje i ukupan broj trombocita u određenoj zapremini krvi i srednji volumen trombocita (eng. *mean platelet volume –MPV*). Povišene vrednosti MPV, koje su povezane sa pojedinim KVB, ali i faktorima rizika za njihov nastanak (49), ukazuju na prisustvo povećanog broja hiper-aktivnih, nezrelih, retikuliranih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita i predstavlja indirektni pokazatelj njihove funkcije. Na osnovu rezultata velikog broja epidemioloških istraživanja i meta-analiza MPV se smatra potencijalnim prognostičkim markerom razvoja bolesti kod pacijenata sa KVB ali njegov značaj u proceni kardiovaskularnog rizika nije potvrđen (50). „Zlatnim standardom“ u ispitivanju funkcije trombocita smatra se metoda optičke agregometrije (eng. *light transmission aggregometry – LTA*), u kojoj se funkcija trombocita procenjuje na osnovu njihove sklonosti ka agregaciji u prisustvu agonista koji se dodaju *in vitro*. Nedostaci ove metode u dijagnostici su nedovoljna tačnost i ponovljivost (51). Odgovor na *in vitro* delovanje agonista predstavlja osnovni princip rada velikog broja savremenih, automatizovanih uređaja koji se danas koriste u rutinskoj dijagnostici poremećaja funkcije trombocita i hemostaze uopšteno (PFA-100®, Ultegra-RPFA®, Hemostasis Analysis System®), čija je najveća prednost simulacija fizioloških uslova hemostaze i minimalna manipulacija uzorka. Pored dijagnostičke primene ove metode se koriste i u istraživanju, u okviru kliničkih ispitivanjima lekova koji deluju na funkciju trombocita. Nedostatak pomenutih metoda, naročito u oblasti istraživanja, predstavlja upotreba nefizioloških koncentracija ograničenog broja agonista i shodno tome mala osetljivost na fine modulare funkcije trombocita, kao i nemogućnost identifikacije preciznih mehanizama delovanja ispitivanih agenasa, od posebnog značaja za ispitivanje delovanje sastojaka hrane.

#### *Protočna citometrija u ispitivanju funkcije trombocita*

Protočna citometrija predstavlja nezamenjivu tehniku u određivanju populacija i subpopulacija krvnih ćelija na osnovu njihovih morfoloških karakteristika i prisustvu određenih antigena na površini. Diferenciranje ćelija na osnovu morfoloških karakteristika zasniva se na upravnom rasipanju zraka svetlosti usmerenog na pojedinačnu ćeliju, koje zavisi od veličine ćelije i bočnom rasipanju, koje zavisi od granulacije i shodno tome karakterističnom položaju na FSC/SSC dijagramu (FSC, od engl. *forward light scatter*, upravno rasipanje svetlosti; SSC, od eng. *side light scatter*, bočno rasipanje svetlosti). Vezivanjem antitela obeleženih fluorescentnim bojama za površinske antigene detektuje se njihovo prisustvo i definiše određeni fenotip ćelijske

populacije. Merenjem srednjeg intenziteta fluorescencije analiziranih ćelija u uzorku zasićenom antitelima moguće je proceniti i gustinu, odnosno intenzitet ekspresije pojedinih površinskih antigena (52).

Prednost primene protočne citometrije u ispitivanju funkcije trombocita, u poređenju sa prethodno opisanim metodama, je detekcija i kvantifikacija celog spektra površinskih receptora trombocita prisutnih na površini neaktiviranih trombocita, koji se koriste kao pan-trombocitni markeri, ili eksprimiranih nakon aktivacije, koji imaju funkciju aktivacionih markera. Stepenn aktivacije trombocita procenjuje se na osnovu procenta trombocita koji na površini eksprimiraju određeni aktivacioni marker u odnosu na ukupnu populaciju analiziranih trombocita, kao i na osnovu gustine receptora. Protočna citometrija se koristi u dijagnostici urođenih i stečenih poremećaja funkcije trombocita, detaljnoj dijagnostici KVB i praćenju odgovora na farmakološku terapiju i različite terapijske procedure, sa nizom prednosti i određenim nedostacima, koji se odnose na dostupnost i cenu aparata i reagenasa kao i neophodnu ekspertizu u radu (53).

Za razliku od kliničke primene, protočna citometrija je nezamenjiva u istraživanjima usmerenim na funkciju trombocita. Princip ove metode omogućava uvid u precizne mehanizme funkcije trombocita i odgovora na različite agoniste u suboptimalnim ili optimalnim koncentracijama kao faktora rizika za razvoj određenih bolesti, specifično delovanje farmakološki i biološki aktivnih agenasa, ispitivanja u *in vitro* eksperimentalnim uslovima. Istovremeno, protočna citometrija je jedina metoda kojom je moguće specifično odrediti procenat heterotipskih agregata trombocita sa drugim krvnim ćelijama (monocitima, neutrofilima, limfocitima) koji se smatraju specifičnijim markerima *in vivo* aktivacije trombocita u odnosu na ekspresiju površinskih antigena (54), kao i mikropartikula trombocitnog porekla (55). Pored površinskih markera, protočna citometrija omogućava i detekciju molekula unutar trombocita i drugih ćelija, uključenih u patogenezu tromboze i ateroskleroze (56). Standardizovani protokoli za primenu protočne citometrije u dijagnostici i istraživanju definišu sve faze laboratorijskog rada, od uzorkovanja do analize i tumačenja dobijenih rezultata, uključujući i analizu direktno pune krvi i minimalnu manipulaciju uzoraka, čime je obezbeđen visok stepen osetljivosti i tačnosti (57, 58). Zbog niza prednosti ova metoda predstavlja metodu izbora u proceni funkcije trombocita kao biomarkera rizika za nastanak hroničnih bolesti, kao i za ispitivanje antitrombocitnog delovanja sastojaka namirnica i lekovitih biljaka kao i identifikaciju potencijalnih mehanizama njihovog delovanja u prevenciji KVB (59).



Aktivacije trombocita i njihova agregacija u *ex vivo* eksperimentalnim uslovima može se indukovati delovanjem velikog broja endogenih agonista kao što se ADP, adrenalin, kolagen, trombin, arahidonska kiselina ili egzogenim agensima kao što je ristocetin, konvulksin, peptid-aktivator trombinskog receptora (eng. *thrombin receptor activating peptide*-TRAP) ili jonofora A23187.

Arahidonska kiselina je prekursor tromboksana A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) koji predstavlja snažan stimulator aktivacije trombocita i njihove agregacije. Primena arahidonske kiseline kao agoniste racionalizuje se i poremećenim statusom ove masne kiseline i njenih metabolita kod osoba sa faktorima rizika za nastanak KVB. Pokazano je da su nivoi TxB<sub>2</sub>, stabilnog metabolita TxA<sub>2</sub>, u serumu ispitanika sa metaboličkim sindromom veći u odnosu na nivoe u serumu zdravih ispitanika (60). Nivo arahidonske kiseline u membranama eritrocita ispitanika sa faktorima kardiovaskularnog rizika takođe koreliše sa akutnim kardiovaskularnim događajima (61).

ADP je intrizični agonista funkcije trombocita i posreduje u aktivaciji indukovano svim ostalim agonistima. Najveći broj studija o delovanju antitrombocitnih agenasa, uključujući sastojke namirnica i same namirnice, zasniva se na inhibitornom delovanju na aktivaciju i agregaciju trombocita indukovano ADP-om. Ispitivanje uticaja biološki aktivnih agenasa na aktivaciju i agregaciju indukovano delovanjem ADP-a, racionalizuju i rezultati prospektivnih studija koji pokazuju povezanost stepena reaktivnosti trombocita kao odgovor na ADP i kardiovaskularnog rizika (32).

Agonističko delovanje različitih agonista ispoljava se vezivanjem za specifične receptore na površini trombocita i pokretanjem niza signalnih događaja, koji rezultuju aktivacijom trombocita i eksprimiranjem odgovarajućih adhezionih receptora. Karakteristike signalnih puteva, koji su uključeni u odgovore na različite agoniste, nisu u potpunosti proučeni.

Delovanje acetil-salicilne kiseline (ASK) zasniva se na inhibiciji sinteze prostanoida u trombocitima, pre svega TxA<sub>2</sub> i prostaglandina (PGE<sub>2</sub> i PGI<sub>2</sub>). Mehanizam delovanja podrazumeva ireverzibilnu inhibiciju enzima ciklooksigenaze -1 (COX-1), koji učestvuje u konverziji arahidonske kiseline u prostaglandin H<sub>2</sub>, koji se dalje konvertuje u TxA<sub>2</sub>, delovanjem enzima tromboksan-sintetaze. Veliki broj studija pokazao je efikasnost niskih doza ASK u primarnoj, sekundarnoj i tercijarnoj prevenciji KVB (62, 63). I pored dugogodišnje primene i intenzivnih istraživanja, podaci o značaju acetil-salicilne kiseline u prevenciji KVB, delovanjem usmerenim na trombocite i mogućim mehanizmima rezistencije i dalje su kontroverzni (64-66).

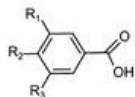
## 1.2. POLIFENOLI

### 1.2.1 Polifenoli kao nenutritivni sastojci namirnica

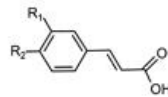
Polifenoli predstavljaju najbrojniju i najzastupljeniju grupu biološki aktivnih, sekundarnih metabolita biljaka. Prisutni su u većini namirnica biljnog porekla uključujući voće, povrće, žitarice, leguminoze, pojedina biljna ulja, vina i biljne čajeve. Po zastupljenosti u ljudskoj ishrani, predstavljaju najznačajniju grupu nenutritivnih sastojaka namirnica. Procenjuje se da dijetarni unos polifenola u evropskim zemljama iznosi približno 1g po danu (67-69). Do sada je identifikovano više stotina različitih jedinjenja polifenolne strukture prisutnih u namirnicama, od kojih, na osnovu hemijske strukture, većina pripada jednoj od četiri osnovne grupe polifenola, fenolnim kiselinama, flavonoidima, stilbenima ili lignanima. Ukupnom dijetarnom unosu polifenola u najvećoj meri doprinose jedinjenja prve dve grupe: fenolne kiseline i flavonoidi. Flavonoidi predstavljaju grupu polifenolnih jedinjenja zajedničke hemijske strukture koju čine dva aromatična prstena povezana sa tri ugljenikova atoma koja su deo heterocikličnog prstena sa kiseonikom. Osnovne podgrupe flavonoida su flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavanoli. Najznačajniji dijetarni izvori flavonoida su voće i voćni sokovi, povrće, kakao i čaj. Fenolne kiseline obuhvataju derivate hidroksi-benzijeve i hidroksi-cimetne kiseline i zahvaljujući njihovom visokom sadržaju u kafi, čaju, voću, voćnim sokovima i žitaricama, imaju značajan udeo u ukupnom dijetarnom unosu polifenola.

Doprinos pojedinih grupa polifenola ukupnom unosu ovih nenutritivnih sastojaka zavisi od velikog broja faktora, od kojih najveći značaj imaju dijetarne navike ispitivane populacije i sadržaj pojedinih grupa polifenola u namirnicama prisutnim u njihovoj ishrani. Pokazano je da se po zastupljenosti u ishrani stanovništva zapadne Evrope flavonoidi nalaze na prvom mestu, doprinoseći najvećim delom ukupnom dnevnom unosu polifenola, dok se u severno-evropskim zemljama dve trećine unosa polifenola ostvaruje unosom fenolnih kiselina, uz veliki doprinos antocijanidina, usled značajnog prisustva jagodastog i bobičastog voća u ishrani. O ukupnom unosu polifenola ili pojedinih grupa polifenolnih jedinjenja u ishrani stanovništva Srbije i zemalja iz okruženja ne postoje relevantni literaturni podaci. Pregled strukture pojedinih grupa polifenola prisutnih u biljkama, dat je na Slici 3.

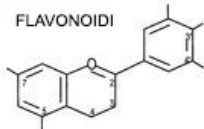
DERIVATI HIDROKSI BENZOJEVE KISELINE DERIVATI CIMETNE KISELINE



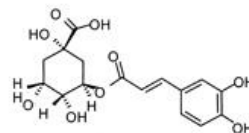
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$  : Protokatehična kiselina  
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$  : Galna kiselina



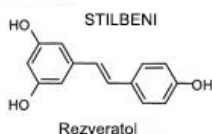
$R_1 = OH$  : Kumarińska kiselina  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Kafena kiselina  
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$  : Ferula kiselina



Slika B)



Hloragena kiselina

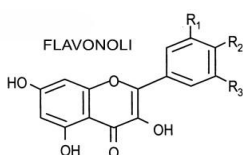


Rezveratol

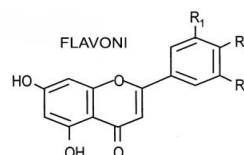


LIGNANI

A)



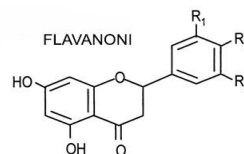
$R_2 = OH; R_1 = R_3 = H$  : Kemferol  
 $R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$  : Kvercetin  
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$  : Miricetin



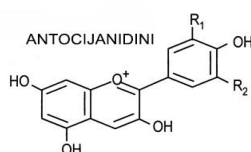
$R_3 = H; R_2 = OH$  : Apigenin  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Luteolin



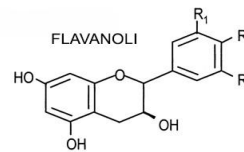
$R_1 = H$  : Dadzein  
 $R_1 = OH$  : Genistein



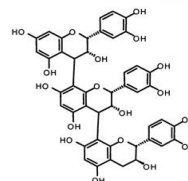
$R_1 = H; R_2 = OH$  : Naringenin  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Eriodiktol  
 $R_1 = OH; R_2 = OCH_3$  : Hesperetin



$R_1 = R_2 = H$  : Pelargonidin  
 $R_1 = OH; R_2 = H$  : Cijanidin  
 $R_1 = R_2 = OH$  : Delfinidin  
 $R_1 = OCH_3; R_2 = OH$  : Petunidin  
 $R_1 = R_2 = OCH_3$  : Malkidin



$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H$  : Katehini  
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$  : Galokatehin



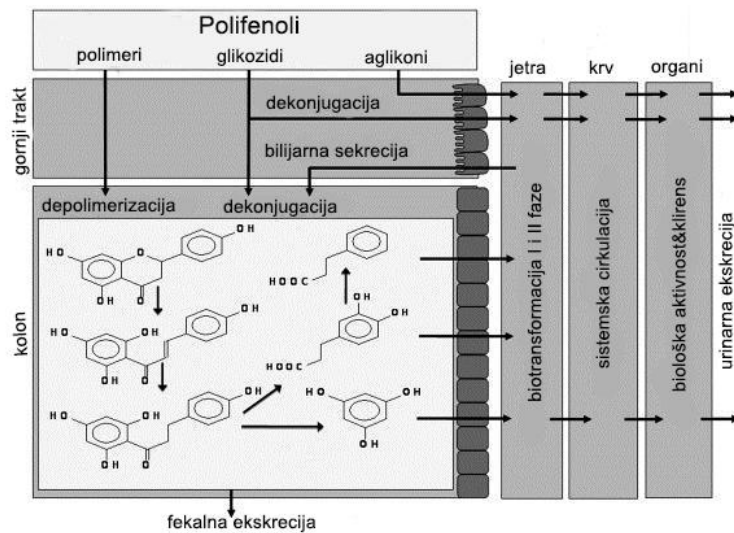
Trimerni procijanidini

B)

Slika 3. Osnovne klase polifenola A) i osnovne grupe flavonoida B)  
 [preuzeto i modifikovano iz Manach i sar., 2005 (70)]

## 1.2.2 Metabolizam polifenola

Polifenoli se u biljkama nalaze u formi glikozida, sa izuzetkom flavan-3-ola i njihovih oligomera, procijanidina. Nakon ingestije, glikozidne forme podležu hidrolizi u digestivnom traktu i oslobođeni aglikoni se jednim delom resorbuju u tankom crevu i dospevaju u ćelije epitela, gde podležu delovanju enzima II faze detoksifikacije. U cirkulaciji će se naći u formi sulfata, glukuronida i/ili proizvoda metilovanja. Putem krvi polifenoli dospevaju do jetre, gde se mogu dalje metabolisati, nakon čega se re-ekskretuju u tanko crevo, a nakon reapsorpcije iz tankog creva, ponovo dospevaju u cirkulaciju i ekskretuju se iz organizma putem urina



Slika 4. Metabolizam polifenola

[preuzeto i modifikovano iz Duynhoven i sar., 2012 (71)]

Deo polifenola, koji se ne resorbuje u tankom crevu, dospeva u kolon i podleže delovanju mikroflore kolona, usled kog dolazi do dekonjugacije i cepanja prstenova osnovne strukture polifenola i formiranja manjih polifenolnih jedinjenja, derivata fenolnih kiselina i cimetne kiseline. Ova jedinjenja se opet delom resorbuju preko epitela kolona i putem cirkulacije dospevaju u jetru, gde podležu metabolizmu enzimima II faze detoksifikacije, nakon čega iz jetre prelaze u cirkulaciju i ekskretuju se putem urina.

Kao posledica intenzivnog metabolizma polifenoli se u cirkulaciji nalaze u jako niskim koncentracijama u odnosu na količine unete u organizam i njihove koncentracije u krvi nalaze se u rasponu od 0 – 4  $\mu\text{mol/L}$  pri dijetarnom unosu od 50 mg

odgovarajućeg aglikona. Količina ekskretovana urinom nalazi se u rasponu od 0,3 - 43% unete količine, zavisno od jedinjenja. Bioraspoloživost polifenola zavisi od klase kojoj određeno polifenolno jedinjenje pripada, mada se značajne razlike mogu uočiti i između jedinjenja iste klase i zavisi velikim delom od njegove specifične strukture. Najveću bioraspoloživost imaju galna kiselina i izoflavoni, zatim glikozidi katehina, flavanona i kvercetina. Najmanju bioraspoloživost imaju proantocijanidini i antocijani (70, 72, 73).

U skladu sa intenzivnim metabolizmom i malom bioraspoloživošću, biološko delovanje polifenola je pre svega rezultat delovanja njihovih metabolita, proizvoda delovanja metaboličkih enzima i mikroflore humanog organizma, sa izraženom inter-individualnom varijacijom. Danas je identifikovano i delom kvantifikovano više od 350 metabolita polifenolnih sastojaka biljaka (74). Biološka aktivnost metabolita se može razlikovati od aktivnosti nativnih jedinjenja, pri čemu je i u jednom i u drugom slučaju često prisutan i „hormetički“ efekat odnosno bi-fazna dozna zavisnost, različita pri niskim i visokim koncentracijama. Shodno tome, finalna potvrda efekata delovanja polifenola moguća je samo u okviru kontrolisanih, randomiziranih dijetarnih interventnih studija. Primena *in vitro* modela racionalna je u predkliničkim istraživanjima, komparativnim „screening“ studijama i ispitivanjima potencijalnih mehanizama koja i u tim slučajevima podrazumeva ispitivanje delovanja metabolita i/ili nativnih jedinjenja u fiziološkim koncentracijama, koje je moguće postići dijetarnim unosom (75). Ispitivanje metabolita u *in vitro* sistemima ograničeno je njihovom komercijalnom dostupnošću i postojanjem metoda za njihovu sintezu.

Jednim delom, povoljni efekti polifenola na zdravlje posledica su njihovog delovanja u digestivnom traktu i zasnivaju se na interakciji nativnih polifenola, u koncentracijama u kojima su prisutni u biljkama, sa komponentama hrane.

### 1.2.3 Polifenoli u prevenciji kardiovaskularnih i malignih bolesti

Na osnovu rezultata meta-analiza više stotina prospektivnih epidemioloških studija, od kojih su pojedine uključivale stotine hiljada ispitanika u desetinama zemalja širom sveta i trajale više desetina godina, potvrđeno je da ishrana bogata voćem, povrćem i integralnim žitaricama smanjuje rizik od nastanka hroničnih nezaraznih bolesti. Bazirane na ovoj tvrdnji pokrenute su brojne inicijative na nacionalnom i globalnom nivou, koje su imale za cilj promociju optimalne dijeta bogate namirnicama biljnog porekla sa povoljnim delovanjem na zdravlje ljudi, ali i inicirana dalja istraživanja, usmerena na ispitivanje uticaja pojedinih sastojaka ovih namirnica na faktore rizika za nastanak hroničnih bolesti, kao i potencijalne mehanizme delovanja.

Naučni podaci o dijetarnim izvorima polifenola, razvoj metoda za njihovo određivanje i kreiranje dostupnih sistematizovanih baza podataka o sadržaju u namirnicama (74), omogućili su evaluaciju specifične uloge polifenola, kao najznačajnijih nenutritivnih biološki aktivnih sastojaka namirnica u prevenciji hroničnih bolesti. Pokazano je da rizik od nastanka KVB, učestalost finalnih ishoda KVB (infarkta miokarda i šloga) i stopa smrtnosti kao posledice KVB zavise delom i od ukupnog dijetarnog unosa polifenola ili pojedinih klasa polifenola (76-79). Međutim, iako se smatraju najznačajnijim dijetarnim antioksidansima, značaj njihovog direktnog antioksidativnog delovanja u očuvanju kardiovaskularnog zdravlja i prevenciji KVB nije potvrđen (80). Naučni eksperti mišljenja su da se preventivna uloga polifenola može pre svega objasniti specifičnim direktnim ili indirektnim delovanjem na nivou endotela i trombocita, kao ključnih činilaca u patogenezi kardiovaskularnih bolesti (81).

Za razliku od uloge u prevenciji KVB, uloga polifenola u prevenciji malignih bolesti nije u potpunosti potvrđena. Pokazano je da dijetarni unos flavonoida ne predstavlja značajnu determinantu smrtnosti od malignih bolesti (76), ali da istovremeno postoji značajna povezanost povećanog dijetarnog unosa pojedinih klasa polifenola i smanjene incidence različitih tipova karcinoma (82, 83).

### 1.3. UTICAJ POLIFENOLA NA FUNKCIJU TROMBOCITA

Ključna uloga trombocita u patogenezi KVB i malignih bolesti i rezultati epidemioloških istraživanja o povezanosti incidence KVB i dijetarnog unosa polifenola, dovela je do pretpostavke da je delovanje polifenola usmereno na trombocite jedan od mehanizama njihovog povoljnog delovanja što je iniciralo brojna istraživanja u ovoj oblasti (81). Veliki broj *in vitro* studija i studija na animalnim modelima pokazao je povoljno delovanje pojedinih polifenola i namirnica koje ih sadrže na funkciju trombocita.

U okviru dijetarnih interventnih studija ispitivano je delovanje različitih polifenolnih jedinjenja, pre svega iz grupe flavonoida i fenolnih kiselina, kao i efekti konzumacije namirnica bogatih polifenolima. Sistematskim pregledom rezultata dobijenih u okviru randomiziranih, kontrolisanih dijetarnih intervencija došlo se do zaključka da povoljno delovanje kakaoa i čokolade, kao i flavan-3-ola i procijanidina kao prisutnih bioaktivnih sastojaka, ima najveći stepen naučne zasnovanosti (84). Akutno ili hronično delovanje ovih namirnica i fitohemikalija na trombocite primenom različitih metoda ispitivano je u 9, od ukupno 25 dostupnih i evaluiranih studija. Povoljno delovanje na neki od markera funkcije trombocita pokazano je u svim studijama, kod zdravih ispitanika (85-89), pušača (90, 91), ispitanika sa dislipidemijom (92) i pacijenata nakon transplatacije srca (93). Pored efekata čokolade, kakaoa i njihovih fitohemikalija, pokazano je i pozitivno delovanje ekstrakta grožđa, soka od grožđa ili crnog vina i njihovih polifenola (94, 95), antocijanima bogatog bobičastog i jagodastog voća (96) i armanjak konjaka bogatog elagitaninima (97). Izoflavoni, ispitvani u okviru jedne studije, nisu pokazali značajno delovanje na trombocite (98), dok su rezultati o delovanju kvercetina i namirnica koji ga sadrže, dobijeni u okviru različitih studija, kontradiktorni (99-101).

Donošenje finalnih zaključaka o delovanju pojedinih namirnica ili pojedinih polifenola meta analizom dobijenih podataka onemogućeno je činjenicom da su u navedenim studijama analizirani različiti parametri funkcije trombocita, primenom različitih metoda kao i razlikama u grupama ispitanika u pogledu zdravstvenog statusa. I pored toga, dokazi o delovanju pojedinih grupa polifenola su uniformni, bez obzira na varijacije u dizajnu studija i poredivi sa delovanjem acetyl-salicilne kiseline (102). Za druge polifenole i njima bogate namirnice neophodno je pružiti dodatne naučne dokaze,

primenom standardizovanih metoda, osetljivih u dovoljnoj meri na preciznu modulaciju parametara funkcije trombocita dijetarnim bioaktivnim komponentama u domenu prevencije.

S obzirom na specifičnosti metabolizma polifenola koje podrazumevaju niske koncentracije u cirkulaciji i brz klirens, dva odvojena načina delovanja pojedinih fitohemikalija na funkciju trombocita, u pogledu potencijalnog mehanizma, predstavljaju akutno delovanje, delovanje jednokratne konzumacije i hronično delovanje, kao efekat dugotrajnih intervencija.

Akutno delovanje može se pripisati direktnim ili indirektnim delovanjem metabolita prisutnih u cirkulaciji na trombocite. Veliki broj namirnica i polifenola ispoljava ovakav efekat, pri čemu aktivacioni status trombocita nakon konzumacije u jednom trenutku postiže najoptimalnije vrednosti koji odgovara maksimalnom efektu, a nakon toga se najčešće vremenski-zavisno približava bazalnim vrednostima. Akutno delovanje polifenola ima poseban značaj na akutno nepovoljno delovanje pojedinih komponenata hrane ili nepravilnog dijetarnog režima, koje ima za posledicu postprandijalnu aktivaciju trombocita, kao i na delovanje drugih štetnih faktora životnog stila (stres, pušenje), koji imaju neželjene efekte na funkciju trombocita.

Efekti dugotrajne konzumacije ispituju se najčešće nakon najmanje 12h gladovanja, kada metaboliti polifenola više nisu prisutni u cirkulaciji. U velikom broju studija, efekti pokazani u toku jednokratne konzumacije nisu potvrđeni efektima nakon dugotrajne intervencije. Međutim, postoje i dokazi o hroničnom efektu pojedinih polifenola i njima bogatih namirnica na funkciju trombocita koji se objašnjavaju na dva načina. Jedan od predloženih mehanizama je kumulativni efekat konstantnog delovanja metabolita polifenola na deo populacije trombocita, koji se reflektuje i nakon njihove ekskrecije, pod uslovom da je njihovo delovanje ireverzibilno (84). Drugi potencijalni mehanizam hroničnog delovanja polifenola je posredni efekat na trombocite kao posledica delovanja na pojedine faktore rizika. U svakom slučaju, iako akutni efekat može da ukaže na eventualni potencijal za hronični efekat, mehanizmi delovanja su različiti, zavise od različitih faktora i optimalni dizajn studije treba da podrazumeva ispitivanje i akutnog i hroničnog delovanja.

S tim u vezi je i delovanje kod ispitanika koje zavisi od njihovog zdravstvenog statusa. Pokazano je da se aktivacioni status trombocita razlikuje kod osoba sa rizikom za nastanak KVB i akutnim bolestima kardiovaskularnog sistema, u odnosu na status zdravih osoba. Povoljan efekat akutnog delovanja polifenola od značaja je generalno,



bez obzira na zdravstveni status, ali ispoljeni efekat veoma često zavisi od statusa, s obzirom da zavisi od fenotipskih karakteristika subpopulacija trombocita, kao što je veći procenat retikuliranih trombocita kod ispitanika sa prisutnim faktorima rizika, za koje je pokazano da imaju manju osetljivost na delovanje antitrombocitnih agenasa. Od značaja može biti i eventualna disfunkcija endotela, prisutna kod ispitanika sa rizikom za nastanak KVB, uzevši u obzir mogućnost da i akutno delovanje polifenola na trombocite može biti delom posledica pokazanog efekta na funkciju endotela.

Kada je reč o hroničnom efektu, ispoljen kod zdravih ispitanika može da ukaže na mogućnost kumulativnog povoljnog delovanja biološki aktivnih sastojaka namirnica ili prevencijom kumulativnog delovanja nepovoljnih činilaca ishrane na trombocite. Kod populacije sa faktorima rizika, ukoliko je delovanje na trombocite praćeno redukcijom pomenutih faktora, teorijsko objašnjenje povoljnog hroničnog delovanja, pored navedenih mehanizama kumulativnog delovanja, obuhvata i delovanje posredovano smanjenjem činilaca faktora rizika (84).

Pored polifenola i druge biološki aktivne komponente namirnica i namirnice koje ih sadrže imaju povoljno delovanje na aktivnost trombocita, kao potencijalnog mehanizma prevencije KVB (103). U okviru dijetarnih interventnih studija pokazani su povoljni efekti masne ribe (104), poli-nezasićenih masnih kiselina (105), mononezasićenih masnih kiselina (106), dijetarnih izvora konjugovane linolenske kiseline (106), L-arginina (107), ekstrakata paradajza (108) i soka od paradajza (109), vitamina C (110) i kivijsa (111), dok je na animalnim modelima pokazano i povoljno delovanje dijetnih vlakana (112) i vitamina E (113).

Potvrđujući značaj delovanja biološki aktivnih nenutritivnih sastojaka namirnica na funkciju trombocita, Evropsko regulatorno telo za bezbednost hrane (eng. *European Food Safety Authority -EFSA*), odnosno ekspertski tim Naučnog panela za dijetetske proizvode, ishranu i alergije (eng. *Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies -NDA*) zaduženo za potvrdu naučne zasnovanosti zdravstvenih izjava vezanih za delovanje namirnica, odnosno njihovih sastojaka, uvrstilo je „smanjenje aktivacije i agregacije trombocita delovanjem namirnica ili sastojaka“ u listu potvrđenih povoljnih delovanja namirnica (114).

#### 1.4. TRADICIONALNE NAMIRNICE KAO IZVOR POLIFENOLA

Tradicionalna hrana predstavlja hranu prisutnu u ishrani ljudi određenog lokaliteta ili regiona tokom dužeg vremenskog perioda, koji delom obuhvata period pre Drugog svetskog rata, kao period pre početka industrijske proizvodnje hrane (115). Osnovne determinante „tradicionalne hrane“ predstavljaju tradicionalne namirnice, tradicionalne recepture i/ili tradicionalni način pripreme. Uopšteno je mišljenje da „tradicionalna hrana“, kao i namirnice koje su njen sastavni deo, ima niz pozitivnih karakteristika, koje se uglavnom odnose na sastav i način pripreme, i na osnovu toga im se veoma često pripisuje pozitivno delovanje na zdravlje ljudi. Ovakve tvrdnje zahtevaju naučnu zasnovanost, naročito uzimajući u obzir da se „tradicionalni“ karakter često eksploatiše od strane proizvođača, kao „dodatna vrednost“ namirnica. Značaj „tradicionalne hrane“ je i očuvanje diverziteta i kolektivnog identiteta unutar sveprisutnije globalizacije, koja ima veliki uticaj i na proizvodnju hrane i obrasce ishrane. Istovremeno, „tradicionalna hrana“ predstavlja važan izvor namirnica koje često nisu deo svakodnevne ishrane savremenog čoveka, naročito u visoko razvijenim zemljama, i izvor velikog broja bioaktivnih sastojaka - fitohemikalija, čije delovanje u promociji zdravlja i prevenciji bolesti nije u potpunosti proučeno.

Namirnice biljnog porekla bogate polifenolima, čije je delovanje na funkciju trombocita tema ove disertacije, predstavljaju tradicionalne namirnice pojedinih evropskih zemalja (116), velikim delom zastupljene i u „tradicionalnoj hrani“ naše zemlje.

Kopriva (*Urtica dioica* L.) je važan sastojak velikog broja različitih tradicionalnih jela, ali se istovremeno koristi i kao lekovita biljka. Osnovne bioaktivne komponente nadzemnog dela biljke u periodu cvetanja su kafena i jabučna kiselina, kao osnovne fenolne komponente, flavonoidi (0,7-1,8%), pre svega rutin i isokvercitrin (0,02%), astragalín i kemferol-3-O-rutinozid, silicijumska kiselina (1-4%); isparljiva ulja, kalijumove soli (0,6% u svežem lišću) i nitrati (1,5-3%). Histamin, serotonin, acetyl-holin, mravlja kiselina i leukotrijeni prisutni su u žaruljama sveže biljke (117). U ispitivanjima na životinjskim i *in vitro* modelima pokazano je da ekstrakt koprive ispoljava brojna biološka delovanja, koja uključuju i delovanje na faktore rizika za nastanak KVB, antiinflamatorno (118), diuretičko, natriuretičko i hipotenzivo dejstvo (119), sniženje nivoa šećera u krvi (120) i inhibiciju aktivacije trombocita (121, 122).

Mirođija (*Anethum graveolens* L.) je veoma zastupljena aromatična biljka, koja se koristi u različitim jelima, ali se sveži i suvi listovi, ili nadzemni deo biljke, smatraju i lekovitom drogom i koriste u fitoterapiji. Osnovna bioaktivna komponenta mirođije je etarsko ulje (0,5-1,5%), koje sadrži karvol, apiol i (+) limonen. Pored etarskog ulja herba mirođije sadrži nitratre (123) i flavonolne glukozide, kvercetin 3-O-beta-D-glukuronid i izoramnetin 3-O-beta-D-glukuronid (124). Biološka aktivnost ekstrakata mirođije, od značaja za smanjenje rizika za nastanak KVB, obuhvata antihiperlipidemično i antihiperholesterolemično delovanje (125) i poboljšanje antioksidativnog statusa jetre i plazme (126), pokazano u animalnim studijama.

Šarplaninski čaj (*Sideritis scardica* Griseb.) predstavlja endemsku biljnu vrstu balkanske regije. Osnovni bioaktivni sastojci šarplaninskog čaja su diterpenoidi, flavonoidi (127) i etarsko ulje (128). Iako se tradicionalno već vekovima koristi u borbi protiv gripa i prehlade, kod alergijskih stanja, teškoća sa disanjem, kod problema sa varenjem, za jačanje imunskog sistema i za ublažavanje napetosti, naučnih podataka o biološkom delovanju vrste *Sideritis scardica* je jako malo. Za druge vrste roda *Sideritis* zastupljene na Balkanskom poluostrvu pokazano je da poseduju antioksidativno i antiinflamatorno delovanje (129).

Kelj (*Brassica oleracea* var. *acephala*) predstavlja važnu povrtarsku biljku familije *Brassicaceae*. Povoljna delovanja na zdravlje ljudi pokazana su indirektno, na osnovu njegove zastupljenosti u ishrani bogatoj voćem i povrćem koja koreliše sa smanjenjem rizika za nastanak KVB (130), mada nema dovoljno direktnih dokaza o uticaju konzumacije kelja na faktore rizika. U ishrani se najčešće koriste listovi ove povrtarske vrste i osnovni biološki aktivni sastojci su glukozinolati (131), polifenoli,  $\beta$ -karoten, vitamin C i dijetna vlakna (132). Najznačajniji polifenolni sastojci kelja su derivati kemferola i kvercetina i derivati hlorogene kiseline (133). Esktrakt kelja ispoljava direktnu antiradikalnu aktivnost (134) i inhibira oksidaciju LDL-a u *in vitro* uslovima(135).

Japanska jabuka predstavlja plod više vrsta roda *Diospyros*. Vodi poreklo iz Azije i predstavlja tipičnu namirnicu pojedinih zemalja Evrope i Azije, pre svega priobalnih oblasti Sredozemnog i Crnog mora. Danas se može naći i na tržištu evropskih zemalja. Biološki aktivni sastojci japanske jabuke su flavonoidi, pre svega kvercetin,  $\beta$ -karoten. Biološka aktivnost japanske jabuke i njenih sastojaka zasniva se na pokazanom antioksidativnom i antiproliferativnom delovanju (136, 137).

Aronija (*Aronia melanocarpa*) pripada porodici *Rosaceae* i potiče iz istočnih delova severne Amerike i istočne Kanade. U Evropi se gaji od početka 20. veka, a na našim prostorima prisutna je već više od 50 godina, mada je šira upotreba aronije prisutna samo poslednjih par godina. Plod i sok aronije predstavljaju dobar dijetarni izvor vitamina C, organskih kiselina i karotenoida (138). Najznačajniji sastojci aronije od kojih potiče većina potencijalnih povoljnih efekata su polifenolna jedinjenja. Plodovi aronije bogati su procijanidinima, antocijanima (25% ukupnih fenola) i fenolnim kiselinama. Aronija se smatra najboljim izvorom antocijana u prirodi, i sadržaj u plodovima ili u sveže iscedenom soku dostiže vrednost od 300-2000mg/100g (138). Pokazano je da aronija ima najvišu antioksidativnu aktivnost u odnosu na sve ostale dijetarne vrste porodice *Rosaceae*, kojoj u najvećoj meri doprinose antocijani (139). U velikom broju interventnih studija pokazano je povoljno delovanje aronije na različite faktore rizika za nastanak KVB, uključujući nivo ukupnog holesterola, LDL-holesterola, oksidovanog LDL-a, triglicerida, glukoze, HbA1c antigena, vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska i indeksa telesne mase (140-142), poboljšanje vazodilatacije zavisne od funkcije endotela (143) i antioksidativnog statusa (144). Uticaj konzumacije ekstrakta aronije na funkciju trombocita ispitan je u okviru dugotrajne intervencije i pokazano je povoljno delovanje kod pacijenata sa metaboličkim sindromom (145).

Nar (*Punica granatum* L) vekovima predstavlja sastavni deo hrane velikog broja naroda. Kao namirnice najčešće se koriste arilusi ploda nara ili sok dobijen njihovim ceđenem, dok u sastav suplemenata veoma često ulaze i masno ulje semena, ili ekstrakti kore ploda ove biljke. Osnovni biološki aktivni sastojci soka od nara su antocijani, organske kiseline, askorbinska kiselina, elagitanini, elagna i galna kiselina, kvercetin, katehin, rutin, kafena kiselina i minerali (146). Biološko delovanje soka, ili ekstrakata nara, obuhvata antioksidativno, antimikrobno, antiinflamatorno i antitumorsko delovanje pokazano u *in vitro* uslovima ili na animalnim modelima. Dijetarne interventne studije pokazale su da dugotrajna konzumacija soka od nara, ili svežeg ploda, dovodi do povećanja antioksidativnog kapaciteta plazme kod zdravih ispitanika, dok kod ispitanika sa faktorima rizika za nastanak KVB rezultuje smanjenjem ukupnog holesterola, odnosa LDL i HDL holesterola, smanjenjem lipidne peroksidacije i ćelijske akumulacije oksidovanog oblika LDL-holesterola (147).

Trombociti imaju važnu ulogu u patogenezi kardiovaskularnih i drugih hroničnih nezaraznih bolesti. Smatra se da se povoljno delovanje ishrane koja uključuje namirnice bogate polifenolima u prevenciji hroničnih bolesti jednim delom zasniva i na delovanju polifenola na funkciju trombocita. Shodno tome osnovni cilj ove doktorske disertacije je ispitivanje uticaja biljaka bogatih polifenolima, prisutnih u ishrani ljudi, na aktivacioni status trombocita kod zdravih osoba i osoba sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti.

U skladu sa tim definisani su sledeći neposredni zadaci istraživanja:

1. Ispitati uticaj ekstrakata biljaka bogatih polifenolima (koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke i aronije) na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima
2. Ispitati uticaj humanih metabolita kvercetina na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima
3. Ispitati uticaj jednokratne konzumacije soka od aronije na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima kod zdravih ispitanika
4. Ispitati uticaj jednokratne konzumacije čaja od koprive, čaja od mirođije i šarplaninskog čaja na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima kod ispitanika sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti
5. Ispitati uticaj jednokratne konzumacije soka od nara na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima kod ispitanika sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti

S ciljem ispitivanja potencijalnih mehanizama delovanja biljnih polifenola na aktivaciju trombocita i njihovu interakciju sa krvnim ćelijama, kao i ispitivanja uticaja na interkaciju sa ćelijama endotela i malignim ćelijama definisani su sledeći zadaci istraživanja.

6. Ispitati uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke i aronije na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u eritrocitima izloženim delovanju vodonik-peroksida
7. Ispitati uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima izloženim delovanju adenzin-difosfata
8. Ispitati uticaj konzumacije soka od aronije na agregaciju trombocita sa EA.hy 929 ćelijama u prisustvu trombina
9. Ispitati uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke na agregaciju trombocita zdravih osoba sa HeLa ćelijama u prisustvu trombina

# MATERIJAL I METODE

## 3.1. MATERIJAL

### 3.1.1. Hemikalije, podloge, antitela i rastvori

Podaci o hemikalijama, antitelima i rastvorima korišćenim u eksperimentalnom radu prikazani su u Tabelama 1, 2 i 3.

Tabela 1. Hemikalije i podloge korišćene u eksperimentalnom radu

Naziv hemikalije	Proizvođač
Folin-Ciocalteu reagens	Sigma-Aldrich, Nemačka
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal (DPPH)	Sigma-Aldrich, Nemačka
2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Kalcein acetoksimetil estar (kalcein AM)	Sigma-Aldrich, Nemačka
2',7'-Dihlorofluorescein-diacetat (DCF-DA)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Adenosin-difosfat (ADP)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Arahidonska kiselina (AA)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Acetil-salicilna kiselina (ASK)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Prostaglandin E <sub>1</sub>	Sigma-Aldrich, Nemačka
3,4-Dihidroksibenzojeva (protokatehuična) kiselina	Sigma-Aldrich, Nemačka
Galna kiselina	Sigma-Aldrich, Nemačka
Magnezijum-hlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Nemačka
Kalcijum-hlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Nemačka
Kalijum-hlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Natrijum-acetat (CH <sub>3</sub> COONa)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Gvožđe (II) sulfat heptahidrat (FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Dihidrorodamin 123 (DHR)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Vodonik peroksid (30%)	Sigma-Aldrich, Nemačka
Fetalni serum govečeta (eng. <i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Sigma-Aldrich, Nemačka

Serumski albumin govečeta (eng. <i>bovine serum albumin, BSA</i> )	Sigma-Aldrich, Nemačka
Histopaque® - 1077	Sigma-Aldrich, Nemačka
Histopaque® - 1119	Sigma-Aldrich, Nemačka
Trombin	Sigma-Aldrich, Nemačka
Penicilin	Sigma-Aldrich, Nemačka
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Nemačka
HEPES	Sigma-Aldrich, Nemačka
Naziv podloge	Proizvođač
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, Nemačka
Eagle-ova podloga modifikovana po Dulbecco-u (eng. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM</i> )	Sigma-Aldrich, Nemačka



Tabela 2. Antitela korišćena u eksperimentalnom radu

Antitela	Antigen	Poreklo / izotip	Proizvođač
Primarna antitela			
Fluoresceinom konjugovano anti humano anti-CD61 antitelo (skr. CD61-FITC)	GPIIIa (u okviru GPIIb/IIIa kompleksa)	mišje /IgG1, κ	BD Biosciences
			Biolegend
Fluoresceinom konjugovano antihumano PAC1 antitelo (skr. PAC1-FITC)	GP IIb/IIIa (sin. αIIbβ3) (na aktiviranim trombocitima)	mišje /IgM, κ	BD Biosciences
Fikoeritriinom konjugovano antihumano anti-CD62P antitelo (skr. CD62P-PE)	CD62P (sin. P-selektin; GMP-140; PADGEM)	mišje /IgG1, κ	BD Biosciences
			Biolegend
Fikoeritriinom konjugovano antihumano anti-CD11b antitelo (skr. CD11b-PE)	CD11b (sin. MAC1) u okviru CD11b/CD18 heterodimera	mišje /IgG2, κ	BD Biosciences
			Biolegend
Peridinin-hlorofil proteinom konjugovano antihumano anti-CD61 antitelo (skr. CD61-PerCP)	GPIIIa (u okviru GPIIb/IIIa kompleksa)	mišje /IgG1, κ	BD Biosciences
Peridinin hlorofil proteinom konjugovano antihumano anti-CD14 antitelo (skr. CD14-PerCP)	CD14	mišje /IgG2, κ	BD Biosciences
Izotipske kontrole			
Fluoresceinom konjugovano antihumano antitelo IgG1 klase (skr. IgG1-FITC)		mišje /IgG1, κ	BD Biosciences
Fluoresceinom konjugovano antihumano antitelo IgM klase (skr. IgM-FITC)		mišje /IgM, κ	BD Biosciences
Fikoeritriinom konjugovano antihumano antitelo IgG1 klase (skr. IgG1-PE)		mišje /IgG1, κ	BD Biosciences
Fikoeritriinom konjugovano antihumano antitelo IgG2 klase (skr. IgG2-PE)		mišje /IgG2, κ	BD Biosciences
Peridinin-hlorofil proteinom konjugovano antihumano antitelo IgG1 klase (skr. IgG1-PerCP)		mišje /IgG1, κ	BD Biosciences
Peridinin-hlorofil proteinom konjugovano antihumano antitelo IgG2 klase (skr. IgG2-PerCP)		mišje /IgG1, κ	BD Biosciences

Tabela 3. Rastvori korišćeni u eksperimentalnom radu

Naziv rastvora	Sastav
Fiziološki rastvor puferovan fosfatom (eng. <i>phosphate buffered saline, PBS</i> )	komercijalan; proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka
Pufer sa natrijum-acetatom	0,4 M $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ pH 4,5 ( $\pm 0,05$ ); (HCl)
Pufer sa kalijum hloridom	0,025 M KCl pH 1 (HCl)
Modifikovani HEPES- <i>Tyrode</i> -ov pufer (HTP)	10 mM HEPES 137 mM NaCl 2.8 mM KCl 1 mM $\text{MgCl}_2$ 12 mM $\text{NaHCO}_3$ 0.4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.35% (w/v) BSA 5.5 mM glukoze pH 7.4 (0.1 M NaOH ili 0.1 M HCl)
Fiziološki rastvor puferovan fosfatom za protočnu citometriju	komercijalan; <i>BD FACS Flow Sheath Fluid</i> ; proizvođač: BD Biosciences, SAD
Rastvor za lizu eritrocita	komercijalan; <i>BD FACS Lysing Solution (10x)</i> ; proizvođač: BD Biosciences, SAD
Rastvor za fiksiranje	komercijalan; <i>CellFIX (10x)</i> ; proizvođač: BD Biosciences, SAD

### 3.1.2. Ispitivani uzorci

Ispitivani uzorci prikazani su u Tabelama 4,5 i 6.

Tabela 4. Uzorci ispitivani u *in vitro* eksperimentalnim uslovima

Ispitivani uzorci	Biljni materijal (latinski naziv biljne vrste)	Ekstragens / opis uzorka	Poreklo biljnog materijala
Suvi ekstrakt koprive	Nadzemni delovi koprive ( <i>Urtica dioica</i> L.)	metanol/voda (70% vol)	Ukrajina
Suvi ekstrakt mirođije	Nadzemni delovi mirođije ( <i>Aenatum graveolens</i> L.)	metanol/voda (70% vol)	Ukrajina
Suvi ekstrakt šarplaninskog čaja	Nadzemni delovi šarplaninskog čaja ( <i>Sideritis scardica</i> L.)	metanol/voda (70% vol)	Bugarska
Suvi ekstrakt kelja	List kelja ( <i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>acephala</i> )	metanol/voda (70% vol)	Turska
Suvi ekstrakt nara	Plod nara ( <i>Punica granatum</i> L.)	metanol/voda (70% vol)	Gruzija
Suvi ekstrakt japanske jabuke	Plod japanske jabuke ( <i>Diospyros spp.</i> )	metanol/voda (70% vol)	Turska
Suvi ekstrakt aronije	Plod aronije ( <i>Aronia melanocarpa</i> L.)	etanol/voda (60% vol)	Srbija
Sok od aronije	Plod aronije ( <i>Aronia melanocarpa</i> L.)	ručno ceđen, matični sok	Srbija
Sok od aronije	Plod aronije ( <i>Aronia melanocarpa</i> L.)	komercijalan, matični sok	Srbija
Sok od nara	Plod nara ( <i>Punica granatum</i> L.)	ručno ceđen, matični sok	Republika Srpska
Sok od maline	Plod maline ( <i>Rubus idaeus</i> L.)	ručno ceđen, matični sok	Srbija
Sok od crne maline	Plod crne maline ( <i>Rubus occidentalis</i> L.)	ručno ceđen, matični sok	Srbija
Sok od crvene ribizle	Plod crvene ribizle ( <i>Ribes rubrum</i> L.)	ručno ceđen, matični sok	Srbija
Sok od crne ribizle	Plod crne ribizle ( <i>Ribes nigrum</i> L.)	ručno ceđen, matični sok	Srbija
Sok od borovnice	Plod borovnice ( <i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	ručno ceđen, matični sok	Srbija

Tabela 5. Metaboliti polifenola ispitivani u *in vitro* eksperimentalnim uslovima

Hemijski naziv metabolita	Matična fitohemikalija	Poreklo
Kvercetin-3-glukuronid	Kvercetin	Metaboliti kvercetina i sulforafana, korišćeni u eksperimentalnom radu, sintetisani su u <i>Institute of Food Research</i> , Norwich, Velika Britanija, po prethodno opisanim metodama (148, 149) i dobijeni ljubaznošću dr Paul A Kroon-a.
3'-Metil-kvercetin-3-glukuronid	Kvercetin	
Kvercetin-3'-sulfat	Kvercetin	
Sulforafan-cistein-glicin	Sulforafan	
Protokatehnična kiselina	Antocijani	Sigma-Aldrich, Nemačka

Tabela 6. Uzorci čiji su efekti ispitivani u okviru dijetarnih intervencija

Interventni proizvod	Biljni materijal (latinski naziv biljne vrste)	Karakteristike	Postupak dobijanja	Poreklo materijala
Sok od aronije	Plod aronije ( <i>Aronia melanocarpa</i> L.)	Matični sok	Komercijalni	Nutrika doo, Srbija
Čaj od koprive	Nadzemni delovi koprive ( <i>Urtica dioica</i> L.)	Infuz	Ph Jug 4	Ukrajina
Čaj od mirođije	Nadzemni delovi mirođije ( <i>Aenatum graveolens</i> L.)	Infuz	Ph Jug 4	Ukrajina
Šarplaninski čaj	Nadzemni delovi šarplaninskog čaja ( <i>Sideritis scardica</i> L.)	Infuz	Ph Jug 4	Bugarska
Sok od nara	Plod nara ( <i>Punicae granatum fructus</i> )	Matični sok	Komercijalni	Pirella doo, Crna Gora

### 3.1.2.1 Biljni materijal

Plodovi maline, crne maline, crvene ribizle i crne ribizle uzorkovani su na komercijalnim plantažama u Srbiji, na lokalitetu Lukovska Banja, na obroncima Kopaonika (1000 m nv). Plodovi su brani ručno u trećoj godini vegetacije u periodu od juna do jula 2008. godine, u periodu tehnološke zrelosti (85% obojenosti voća) svake od uzorkovanih vrsta. Plodovi samonikle borovnice uzorkovani su na njihovom prirodnom staništu, na tri različita lokaliteta u blizini pomenutih plantaža, u avgustu 2008. godine. Plodovi samoniklog nara uzorkovani su u okolini Trebinja, Republika Srpska, u avgustu 2010. godine. Plodovi aronije uzorkovani su na komercijalnim plantažama na lokalitetu Suvobor (760m nv) u periodu komercijalne zrelosti, u avgustu 2012. godine.

Plodovi navedenog jagodastog i bobičastog voća, nara i aronije se odmah po uzorkovanju korišćeni za izradu sokova (Poglavlje 3.1.2.2).

Uzorci biljnog materijala koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke uzorkovani su u zemljama crnomorskog regiona, u periodu od juna do

oktobra 2010. godine. Nadzemni delovi koprive i mirođije uzorkovani su na privatnim plantažama i pijacama u Uzhorod-u, u Ukrajini. Odmah nakon uzorkovanja uzorci su osušeni u sušnici, na temperaturi od 50°C, u trajanju od 2-3h. Plodovi japanske jabuke uzorkovani su na pijacama u Istambulu, a listovi kelja uzorkovani su na lokalnim plantažama u mestu Akcaabat, u blizini Trabzon-a u priobalnoj regiji Turske. Oba uzorka su liofilizovana odmah nakon uzorkovanja. Nadzemni delovi šarplaninskog čaja sakupljeni su sa različitih lokacija planine Pirin, u blizini makedonsko-bugarske granice. Nakon sakupljanja, uzorci su sušeni na vazduhu, zaštićeni od svetlosti, na promajnom mestu, u trajanju od dve nedelje. Plodovi gajenog nara uzorkovani su na pijacama u Tblisi-ju, u Gruziji i korišćeni za izradu ekstrakata bez prethodnog sušenja. Svi uzorci sakupljeni su sa najmanje tri različita lokaliteta i kao kompozitni uzorci korišćeni u daljoj obradi.

#### 3.1.2.2. Izrada sokova

Sveži, neoštećeni plodovi maline, crne maline, crvene ribizle, crne ribizle, borovnice i aronije su homogenizovani u kuhinjskom blenderu (procesoru) i iz dobijene smeše sok je isceden ručno, presovanjem kroz pamučnu filter tkaninu. Prinos ovako dobijenih sokova od maline, crne maline, crvene ribizle, crne ribizle, borovnice, aronije inara, u odnosu na sveže plodove, iznosio je 50 %; 52 %; 55 %; 31 %; 67 %, 53 % i 37 %, redom.

#### 3.1.2.3. Izrada suvih ekstrakata

Osušeni uzorci koprive, mirođije, kelja, šarplaninskog čaja i japanske jabuke usitnjeni su kuhinjskim mlinomi ekstrahovani 70 % (v/v) metanolom, u odnosu 1:10 (masa uzorka, g : zapremina 70% metanola, mL), na magnetnoj mešalici. Nakon ekstrakcije u trajanju od 20 min, na konstantnoj temperaturi od 70°C, uzorak je proceden kroz pamučnu filter tkaninu. Ostatak nakon ceđenja ponovo je ekstrahovan na isti način još dva puta. Metanolni ekstrakti su objedinjeni, cenrifugirani na 3000 rpm u trajanju od 10 min, a dobijeni supernatanti procedeni dodatno kroz pamučnu filter tkaninu. Rastvarač je uklonjen uparavanjem na vakum uparivaču, na temperaturi od 40°C.

Arilusi svežeg nara odvojeni su od ostalog dela ploda, homogenizovani u kuhinjskom procesoru i ekstrahovani 70 % (v/v) metanolom, u odnosu 1:3 (zapremina

samlevenog uzorka, g : zapremina 70% metanola, mL), a zatim procesuirani po prethodno opisanom protokolu.

Sveži plodovi aronije homogenizovani su u kuhinjskom procesoru i ekstrahovani 60 % (v/v) rastvorom etanola, uz dodatak 0,01% HCl-a, u odnosu 1:3 (zapremina samlevenog uzorka, g : zapremina 60 % etanola, mL). Rastvarač je nakon perkolacije uklonjen uparavanjem na vakuum uparivaču na temperaturi od 40 °C.

Dobijeni ekstrakti dodatno su sušeni u vakuum-eksikatoru, na sobnoj temperaturi, do konstantne mase. Sadržaj vlage u suvim ekstraktima, određen sušenjem u sušnici na 100-105 °C do konstantne mase, nije bio viši od 5%. Svi suvi ekstrakti čuvani su na sobnoj temperaturi, u atmosferi azota, uz prisustvo sredstva za desikaciju.

Prinos ekstrakcije za ekstrakte koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja i japanske jabuke i nara iznosio je: 9,79 %; 18,23 %; 12,35 %; 29,08 %; 63,18 %, redom, dok je za ekstrakte nara i aronije prinos iznosio 8,17% i 7,16%, redom.

#### 3.1.2.4 Namirnice korišćene u dijetarnim interventnim studijama

U studiji delovanja soka od aronije na funkciju trombocita korišćen je komercijalni matični sok aronije kompanije Nutrika doo, Srbija, proizveden u skladu sa važećim pravilnicima o kvalitetu proizvoda od voća (150, 151). Korišćeni sok aronije dobijen je mehaničkom preradom (homogenizacijom i presovanjem) zdravih tehnološki zrelih plodova aronije, uz tretman homogenizovane kaše pektinazom pre presovanja, konzervisan kratkotrajnom pasterizacijom u trajanju od nekoliko sekundi na 90°C i filtriran u cilju dobijanja bistrog soka.

U studiji delovanja tradicionalnih biljaka na funkciju trombocita korišćeni su čajevi pripremljeni poproceduri za izradu infuza, a u skladu sa monografijom Ph Yug IV (152). Ukratko, 2g suvog biljnog materijala preliveno je sa 100 mL ključale vode a nakon 10 min čaj je proceden i dobijena zapremina dopunjena do ukupne zapremine od 200 mL toplom vodom.

U studiji delovanja soka od nara na funkciju trombocita korišćen je komercijalni mutni matični sok nara kompanije Pirella doo, Crna Gora, proizveden u skladu sa važećim pravilnikom o kvalitetu proizvoda od voća (150). Korišćeni sok nara dobijen je mehaničkom preradom (homogenizacijom i presovanjem) zdravih tehnološki zrelih celih plodova nara, konzervisan kratkotrajnom pasterizacijom u trajanju od nekoliko sekundi na 90°C i bez filtiranja.

### 3.1.3. Čelijske linije

U *in vitro* eksperimentima korišćene su tumorske čelijske linije humanog porekla gajene u kulturi: HeLa ćelije karcinoma grlića materice, Fem-X ćelije melanoma, LS 174 ćelije karcinoma kolona, MCF-7 ćelije karcinoma dojke, PC-3 ćelije karcinoma prostate i K562 ćelije mijeloidne leukemije. Kao model endotelnih ćelija korišćena je kontinuirana endotelna čelijska linija EA.hy926 nastala spajanjem humanih endotelnih ćelija porekla iz umbilikalne vene (HUVEC ćelija) i kontinuirane humane čelijske linije karcinoma pluća A549. Sve ćelije nabavljene su preko American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, SAD). Tumorske ćelije gajene su u osnovnom hranljivom medijumu (RPMI1640) uz dodatak fetalnog seruma govečeta (10%), L-glutamina (3mM), penicilina (100 IU/mL), streptomicina (100µg/mL) i HEPES-a (25 mM), pri pH 7.2 podešenoj bikarbonatnim puferom. EA.hy926 ćelije gajene su u komercijalnoj DMEM hranljivoj podlozi, (Eagle-ovoj hranljivoj podlozi modifikovanoj po Dulbecco-u tako da sadrži 4mM L-glutamina, 4.5 g/L glukoze, 1mM natrijum-piruvata i 1.5 g/L natrijum-bikarbonata) uz dodatak fetalnog seruma govečeta (10%), penicilina (100 IU/mL), i streptomicina (100µg/mL), pri pH 7.2. Sve ćelije su gajene na temperaturi od 37°C, u atmosferi vazduha sa 5% ugljen dioksida.

### 3.1.4. Izolovane krvne ćelije

Krvne ćelije korišćene u *in vitro* ispitivanjima izolovane su iz pune krvi dobrovoljaca dobijene venepunkcijom uz prisustvo natrijum-citrata kao antikoagulansa (0.9%). Za izolovanje eritrocita puna krv je centrifugirana 20 min na 2880 x g i nakon odvajanja plazme ćelije su ispirane 3 puta fiziološkim rastvorom, uz uzastopno centrifugiranje na 1860 x g u trajanju od 10 min.

Trombociti su izolovani iz pune citratne krvi uz dodatak prostaglandina E1 (PGE1; 1 µM) centrifugiranjem 20 min na 200 x g. Nakon centrifugiranja gornje dve trećine sloja plazme prebačeno je u novi sud, centrifugirano 20 min na 800 nm, supernatant je odlivan, a talog trombocita pažljivo ispiran u puferu za ispiranje trombocita (PIT) i resuspendovan u HEPES-Tyrode-ovom puferu (HTP) do odgovarajuće koncentracije. Broj krvnih ćelija u alikvotu suspenzija određivan je na hematološkom analizatoru (Coulter Ac.T Diff, Beckman Coulter, SAD).

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Određivanje ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u analiziranim sokovima i ekstraktima određivan je spektrofotometrijski na osnovu reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom (153, 154). Analizirani sokovi razblaženi su destilovanom vodom i centrifugirani. Analizirani ekstrakti rastvoreni su u vodi ili metanolu u koncentraciji od 50 mg/mL, centrifugirani i dobijeni supernatanti korišćeni su u daljim ispitivanjima. Dve stotine mikrolitara radnog rastvora sokova ili ekstrakta herbe je dodato u 1 ml razblaženog (1:10) FC reagensa. Posle 4 min, dodato je 800 µL natrijum-karbonata (75 g/L). Nakon 2 h inkubacije na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbancija na 765 nm. U istim eksperimentalnim uslovima izmerena je apsorbancija reakcionih proizvoda serije razblaženja galne kiseline (0-600 µg/mL) i konstruisana standardna kriva. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po g ekstrakta, odnosno 100 mL analiziranih sokova. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

### 3.2.2. Određivanje ukupnih antocijana

Sadržaj ukupnih antocijana određivan je primenom pH diferencijalne metode (Lee et al.). Uzorci ispitivanih sokova i ekstrakata rastvoreni su u puferu kalijum-hlorida (pH 1) i acetatnom puferu (pH 4.5) u odgovarajućim koncentracijama. Apsorbancije dobijenih rastvora merene su na talasnim dužinama od 520 nm i 700 nm. Rezultati su izraženi kao sadržaj ekvivalenata cijanidin-3-glukozida u mg/mL ispitivanih sokova ili mg/g ispitivanih ekstrakata. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna određivanja.

### 3.2.3. Određivanje rastvorljive suve materije, ukupne kiselosti i pH vrednosti

Navedeni parametri određivani su u voćnim sokovima metodama koje su defnisane važećim pravilnikom o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća (155). Rastvorljiva suva materija određivana je refraktometrijskom metodom na konstantnoj temperaturi (21°C), korišćenjem Abbe-ovog refraktometra (Carlo Erba, Italija). Ukupna kiselost



određivana je titiranjem rastvora sokova (25mL soka + 225 mL destilovane vode) rastvorom natrijum hidroksida (0,1mol/L) uz korišćenje fenol-ftaleina kao indikatora (10 g/L u 95%-nom etanolu), dok je pH vrednost uzoraka merena pH-metrom (WTW, Nemačka) na sobnoj temperaturi. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna određivanja.

### 3.2.4. Ispitivanje antiradikalske aktivnosti

Antiradikalska aktivnost analiziranih uzoraka ispitivana je primenom DPPH eseja, na osnovu sposobnosti neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala po metodi Okawa i saradnika (156). Napravljena je serija razblaženja ispitivanih uzoraka u 70% etanolu. Po 4 mL ovih rastvora je pomešano sa 1 mL 0,5 mM rastvora DPPH u 70% etanolu i ostavljeno u mraku 30 min. Apsorbancija rastvora je zatim merena na 517 nm. Procenat neutralizacije DPPH radikala je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$I (\%) = [(A_k - A_a) / A_k] \times 100$$

u kojoj  $A_k$  predstavlja apsorbanciju negativne kontrole (koja umesto rastvora ekstrakta sadrži 4 mL odgovarajućeg rastvarača), a  $A_a$  apsorbanciju uzoraka.

Konstruisan je grafik zavisnosti procenta neutralizacije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta. Koncentracije ekstrakata koje neutrališu 50% DPPH radikala ( $EC_{50}$  vrednosti) su zatim određene korišćenjem algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

### 3.2.5. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti

Antiproliferativna aktivnost ispitivanih uzoraka određivana je primenom KBR testa po metodi Clothier-a (157). KBR test (metod vezivanja Kenacid Blue boje) zasniva se na određivanju sadržaja ukupnih proteina, koji je srazmeran broju ćelija.

Maligne ćelije su nakon tripsinzacije resuspendovane u hranljivoj podlozi i zasejavane u mikropločama sa 96 bazena u optimalnoj gustini koja je iznosila 2000 ćelija po bazenu za HeLa, Fem-X, MCF-7, PC-3 i K562 ćelije i 7000 ćelija po bazenu za LS 174 ćelije. Nakon 24h od zasejavanja ćelija, adherirane ćelije tretirane su serijom razblaženja ispitivanih uzoraka u hranljivom medijumu. Ćelijama u kontrolnim bazenima dodavan je samo hranljivi medijum sa kao slepe probe korišćena su odgovarajuća razblaženja ispitivanih uzoraka dodavana u bazene bez ćelija. Nakon 72h kontinuiranog delovanja ispitivanih agenasa hranljivi medijum iz bazena je odbačen a

ploče ispirane dva puta rastvorom fosfatnog pufera sa solima (PBS-phosphate buffered saline). Nakon toga ćelije su fiksirane smešom metanola i sirćetne kiseline (3:1) u trajanju od 20 minuta, a zatim bojene 0.04% rastvorom boje Coomassie Brilliant Blue R-250 u smeši 25% etanola i 1% glacijalne sićetne kiseline u trajanju od 2-3h. Ćelije se nakon tog vremena tri puta ispiraju PBS-om i na kraju tretiraju rastvorom za rastvaranje (1M natrijum acetat u 70% etanolu). Apsorbancija se meri 2h kasnije, na talasnoj dužini od 570 nm, na čitaču mikroploča.

Preživljavanje (S, od engl. *survival*-preživljavanje) je kvantifikovano korišćenjem formule za dobijanje indeksa preživljavanja:

$$S = \frac{A_{uzorka} - A_{sl.proba}}{A_{kontrola} - A_{sl.proba}}$$

u kojoj  $A_{uzorka}$  predstavlja srednju vrednost izmerene apsorbance na 570 nm u bazenima sa tretiranim ćelijama;  $A_{kontrola}$  srednju vrednost izmerene apsorbance na 570 nm u bazenima sa netretiranim ćelijama; a  $A_{sl.proba}$  srednju vrednost izmerene apsorbance na 570 nm u bazenima bez ćelija, a sa rastvorom ispitivane supstance.

Množenjem indeksa preživljavanja (S) sa 100, dobija se procenat preživljavanja (S%). IC50 je koncentracija citotoksičnog agensa koja indukuje 50% inhibicije u preživljavanju ciljnih ćelija. Ova vrednost se koristi kao mera intenziteta antiproliferativnog dejstva nekog agensa na osnovu redukcije stope rasta, odnosno smanjenja broja ćelija u odnosu na kontrolne ćelije.

### **3.2.6. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti na ćelijama u *in vitro* eskperimentalnim uslovima**

Antioksidativna aktivnost ispitivanih uzoraka na ćelijama, u *in vitro* uslovima, ispitivana je po metodi Honzel i saradnika (158), određivanjem antioksidativne zaštite eritrocita i neutrofila, kao ćelijskih modela, izloženih oksidativnom stresu delovanjem vodonik peroksida. Test ćelijske antioksidativne zaštite (eng. *cellular antioxidant protection assay*, *CAP-assay*) zasniva se na određivanju nivoa intraćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) bojenjem ćelija intraćelijskom bojom: 2',7'-dihlorofluorescein-diacetatom (DHF-DA). U reakciji ovih jedinjenja sa intraćelijskim reaktivnim vrstama kiseonika dolazi do formiranja fluorescentnih jedinjenja, dihlorofluoresceina i rodamina, čija je fluorescencija određivana primenom protočne citometrije.

Izolovane krvne ćelije, tretirane su rastvorima ispitivanih ekstrakata i rastvorom DMSO-a kao kontrole, u trajanju od 1h na 37°C. Nakon inkubacije ćelije su ispirane (2x) PBS-om da bi se uklonili ekstraćelijski antioksidansi i inkubirane sa rastvorom DHF-DA (50µM,) 30 min na 37 °C, u mraku. Ćelije su nakon inkubacije sa bojom ponovo ispirane (2x) PBS-om i tretirane rastvorom vodonik-peroksida (1 mM) u trajanju od 30 minuta na 37°C. Nivo intaćelijskih RVK u ćelijama određivan je primenom protočne citometrije korišćenjem aparata FACSCalibur (Becton Dickinson, USA), na osnovu fluorescencije dihlorofluoresceina, fluorescentnog proizvoda DHF-DA sa intraćelijskim vodonik-peroksidom. Relativna vrednost fluorescence ispitivanih ćelija analizirana je primenom CellQuest softvera (Becton Dickinson, USA) i izražena kao geometrijska sredina intenziteta fluorescence svih analiziranih ćelija (eng. *mean fluorescence intensity, MFI*). Rezultati su prikazani kao procenti inhibicije MFI vrednosti u uzorcima pretretiranim ispitivanim ekstraktima i tretiranim rastvorom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odnosu na MFI vrednost u kontrolnom uzorku, tretiranom rastvorom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost dva ponovljena određivanja.

### **3.2.7. Određivanje parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa leukocitima primenom protočne citometrije**

#### 3.2.7.1 Uzorkovanje krvi

Krv zdravih dobrovoljaca i ispitanika sa metaboličkim sindromom uzorkovana je na tašte, nakon najmanje 12h gladovanja, u ranim jutarnjim časovima (8-9h), a uzorkovanju je prethodio period potpunog mirovanja u trajanju od najmanje 20 minuta. Krv je uzorkovana u skladu sa standardnim protokolima za određivanje markera aktivacije trombocita i agregacije trombocita i leukocita metodom protočne citometrije (57, 58) koji podrazumevaju venepunkciju bez upotrebe poveske, korišćenje igle sa najmanjim promerom od 21g, netraumatičnu venepunkciju i odbacivanje najmanje 2 mL krvi na početku uzorkovanja. Krv je uzorkovana u *Vacutainer* epruvetama sa natrijum-citratom (0.9%) kao antikoagulansom. Uzorci krvi su korišćeni u daljoj analizi odmah po venepunkciji, uz minimalnu manipulaciju uzoraka, na sobnoj temperaturi.

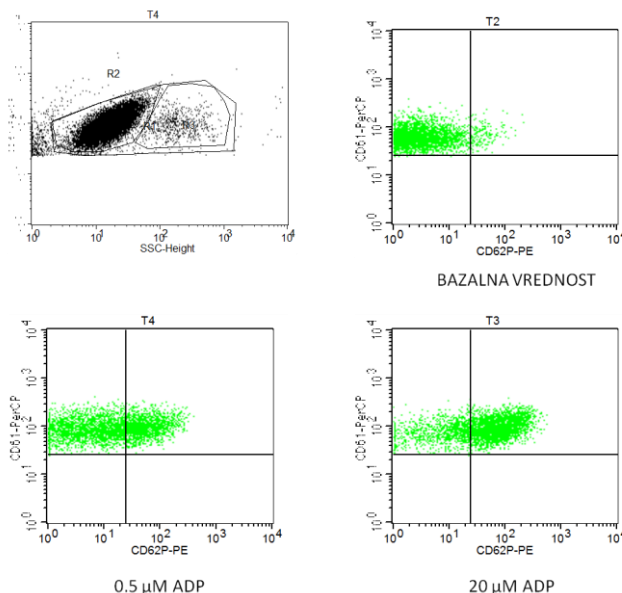
#### 3.2.7.2 Određivanje parametara aktivacije trombocita

Kao markeri aktivacije trombocita određivani su površinski antigeni P-selektin i/ili GPIIb-IIIa, u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja agonista. Ekspresija ovih

antigena određivana je korišćenjem antihumanih anti-CD61, anti-CD62P i PAC1 antitela, obeleženih fluorescentim bojama, primenom protočne citometrije. U eksperimentalnom radu korišćen je protočni citometar FACSCalibur, proizvođača BD Biosciences (SAD) sa integralnim CellQuest softverom za analizu dobijenih podataka.

Ekspresija aktivacionih markera određivana korišćenjem pune krvi ispitanika po prethodno opisanim metodama (57, 159). Puna krv ispitanika je odmah nakon venepunkcije razblažena HTP rastvorom u odnosu 1:10. Alikvoti razblažene krvi (70  $\mu$ L) neposredno po razblaživanju ili nakon inkubacije sa određenim agensima, obeleženi su anti-CD61-PerCP, anti-CD62P-PE i PAC-1-FITC antitelima (5  $\mu$ L) i odmah nakon toga tretirani rastvorima agonista, adenozin-difosfatom (ADP) u finalnim koncentracijama od 0,5  $\mu$ M i/ili 20  $\mu$ M i/ili natrijum-arahidonatom u finalnoj koncentraciji od 250 $\mu$ g/mL. Alikvoti razblažene krvi obeleženi antitelima, bez dodatka agonista a uz dodatak iste zapremine HTP-a, korišćeni su za određivanje aktivacionih markera trombocita u bazalnim uslovima. Nakon dodavanja agonista ili HTP-a uzorci su inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon završene inkubacije uzorci su fiksirani dodatkom CellFix rastvora (350  $\mu$ L), inkubirani 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku i odmah analizirani na protočnom citometru. Antihumana IgG1-FITC, IgG2-PE i IgM-FITC antitela korišćena su kao izotipske kontrole za određivanje nespecifičnog vezivanja antitela. Optimalne zapremine korišćenih antitela određene su titracijom u okviru preliminarnih eksperimenata, korišćenjem krvi 3 ispitanika sa metaboličkim sindromom. Ekspresija analiziranih markera aktivacije određivana je u populaciji od 20000 trombocita (CD61 pozitivnih ćelija, CD61+) i izražena kao procenat P-selektin i GPIIbIIIa pozitivnih trombocita (CD62P+CD61+ ćelija) u ukupnoj populaciji analiziranih trombocita i kao geometrijska sredina intenziteta fluorescencije ukupne populacije trombocita (eng. *mean fluorescence intensity, MFI*), srazmerna prosečnoj gustini aktivacionih markera na pojedinačnom trombocitu. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost dva uzastopna određivanja. Dodatno, pojedini rezultati su prikazani i kao „indeks aktivacije trombocita“ -IAT (eng. *index platelet activation, IPA*) za svaki od određivanih antigena, kao proizvod udela antigen pozitivnih trombocita u analiziranoj populaciji trombocita i odgovarajuće MFI vrednosti, na osnovu jednačine  $MPA = \% \times MFI / 100$ , kao pokazatelj relativnog broja antigena na površini antigen-pozitivnih trombocita(160).

Reprezentivni CD61-PerCP/CD62P-FITC i CD61-PerCP/PAC-1-FITC dijagrami u ukupnoj populaciji trombocita prikazanoj na FSC/SSC dijagramu u nestimulisanim uzorcima i uzorcima stimulisanim suboptimalnom i optimalnom koncentracijom ADP, prikazani su na slikama 5 i 6.

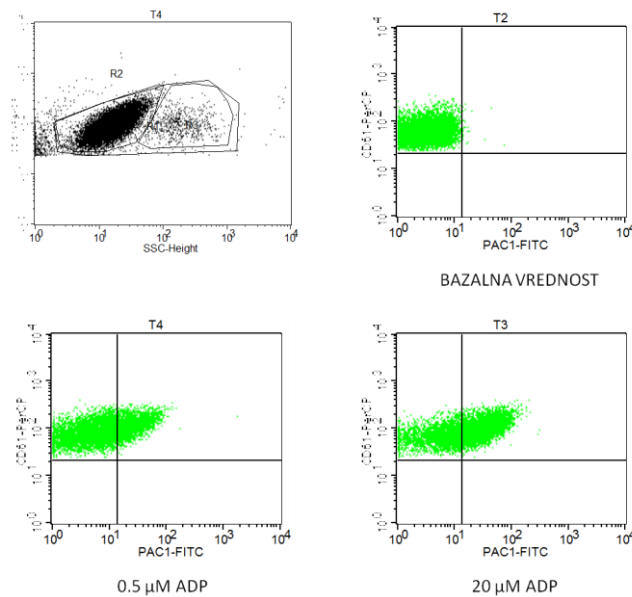


Slika 5. Reprezentivni FSC/SSC dijagram populacije trombocita (a) i CD61-PerCP/CD62P-FITC dijagrami u bazalnim uslovima (b) i nakon delovanja 0,5  $\mu\text{M}$  ADP (c) i 20  $\mu\text{M}$  ADP (d).

#### *Određivanje parametara aktivacije trombocita u in vitro eksperimentalnim uslovima*

Za ispitivanje delovanja analiziranih ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke, kao i delovanja sulforafan-cistein-glicina, kvercetin-3-glukuronida, 3-0-metil-kvercetin-3-glukuronida i kvercetin-3'-sulfata u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, prethodno opisana metoda modifikovana u skladu sa metodom Frelingera i saradnika (159). Radni rastvori ispitivanih ekstrakata i metabolita dobijeni su rastvaranjem u DMSO-u, u koncentraciji od 100 mg/mL za ekstrakte i 20 mM za metabolite. Alikvoti (1 mL) uzoraka krvi ispitanika prethodno razblažene HTP rastvorom u odnosu 1:10. inkubirani su sa radnim rastvorima ispitivanih ekstrakata i metabolita u finalnoj koncentraciji od 200  $\mu\text{g/mL}$  za ekstrakte i 40 mM za metabolite u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi. U istim eksperimentalnim uslovima alikvoti razblažene pune krvi inkubirani su sa DMSO-om u finalnoj koncentraciji od 0,2%, koji je korišćen kao negativna kontrola. Nakon inkubacije 70  $\mu\text{L}$  krvi tretirane ispitivanim ekstraktima i metabolitima i DMSO-om obeleženo je anti-CD61-PerCP, anti-CD62P-PE i PAC1-FITC antitelima i tretirano rastvorom natrijum-arahidonata, kao agonista

aktivacije trombocita, u finalnoj koncentraciji od 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Dalje su uzorci procesuirani na način kako je to prethodno opisano (Odeljak 3.2.7.2).



Slika 6. Reprezentativni FSC/SSC dijagram populacije trombocita ( $n = 20000$ ) (a) i CD61-PerCP/PAC1-FITC dijagrami u bazalnim uslovima (b) i nakon delovanja 0,5  $\mu\text{M}$  ADP (c) i 20  $\mu\text{M}$  ADP (d).

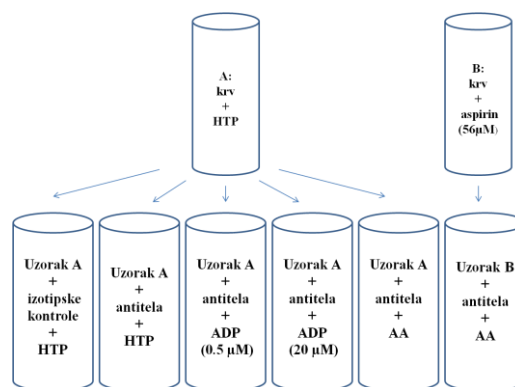
U *in vitro* eksperimentalnim uslovima ispitivano je i delovanje dve frakcije etanolnog ekstrakta aronije, frakcije rastvorne u metanolu (F1) i frakcije rastvorne u vodi (F2) na markere aktivacije trombocita. Analizirana je ekspresija P-selektina i GPIIb-IIIa markera kao odgovor na *ex vivo* delovanje ADP-a kao agonista aktivacije u koncentraciji od 0,5  $\mu\text{M}$ . Neposredno pre izlaganja ćelija delovanju metanolne frakcije ekstraktant je uklonjen uparavanjem na vakuum uparivaču ( $T = 70^{\circ}\text{C}$ ) i frakcija je rekonstituisana istom zapreminom vode.

#### *Određivanje parametara aktivacije trombocita u okviru dijetarnih interventnih studija*

U toku ispitivanja efekta jednokratne konzumacije soka od aronije određivana je ekspresija P-selektina kao markera aktivacije trombocita, pre i posle konzumacije ispitivanog soka, u bazalnim uslovima i nakon delovanja agonista, arahidonske kiseline i ADP-a, kao i nakon delovanja arahidonske kiseline na razblaženu krv prethodno tretiranu acetil-salicilnom kiselinom po prethodno opisanom protokolu. Ukratko, nakon venepunkcije krv je razblažena u HTP-u (1:10) i alikvoti krvi (1mL) inkubirani su 30 minuta na sobnoj temperaturi sa radnim rastvorom acetil-salicilne kiseline u finalnoj koncentraciji od 56  $\mu\text{M}$  ili istom zapreminom HTP-a. Alikvoti razblažene netretirane

krvi (70  $\mu\text{L}$ ) tretirani su anti-CD61-FITC i anti-CD62P-PE antitelima (5  $\mu\text{L}$ ) i odmah nakon toga tretirani rastvorima agonista, natrijum-arahidonatom u finalnoj koncentraciji od 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$  i adenzin-difosfatom (ADP) u finalnoj koncentraciji od 0,5  $\mu\text{M}$ . Alikvoti razblažene krvi obeleženi antitelima, bez dodatka agonista a uz dodatak iste zapremine HTP-a, korišćeni su za određivanje aktivacionih markera trombocita u bazalnim uslovima. Alikvot razblažene krvi prethodno tretirane acetil-salicilnom kiselinom, tretiran je antitelima i natrijum arahidonatom kao agonistom. Antihumana IgG1-FITC, IgG2-PE i IgM-FITC antitela korišćena su kao izotipske kontrole. Uzorci su dalje procesuirani kao što je to prethodno opisano u odeljku 3.2.7.2.

U toku ispitivanja efekta jednokratne konzumacije infuza koprive, mirođije i planinskog čaja, određivana je ekspresija P-seletina i GP IIb-IIIa antigena, kao markera aktivacije trombocita, pre i posle konzumacije ispitivanih čajeva, odnosno vode, u bazalnim uslovima i nakon delovanja agonista, arahidonske kiseline u finalnoj koncentraciji od 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$  i ADP-a u dve koncentracije koje su finalno iznosile 0,5  $\mu\text{M}$  i 20 $\mu\text{M}$ , kao i nakon delovanja arahidonske kiseline na trombocite prethodno tretirane acetilsalicilnom kiselinom u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, na prethodno opisan način. Uzorci razblažene krvi obeležavani su anti-CD61-PerCP, anti-CD62P-PE i PAC-1-FITC antitelima i dalje procesuirani kako je to opisano u odeljku 3.2.7.2. Šematski prikaz opisanog protokola dat je na slici 7.



Slika 7. Šematski prikaz protokola

U toku ispitivanja efekta jednokratne konzumacije soka od nara određivana je ekspresija P-seletina i GP IIb-IIIa antigena, kao markera aktivacije trombocita, pre i posle konzumacije soka ili vode, u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja ADP- a kao agonista, u dve koncentracije koje su finalno iznosile 0,5  $\mu\text{M}$  i 20 $\mu\text{M}$ . Uzorci

razblažene krvi neposredno po venepunkciji tretirani su anti-CD61-PerCP, anti-CD62P-PE i PAC-1-FITC antitelima i dalje procesuirani na prethodno opisan način.

### 3.2.7.3 Određivanje parametara agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima

Agregati trombocita sa monocitima, TMA (eng. *platelet-monocyte aggregates, PMA*) u ukupnoj populaciji monocita i agregati trombocita sa neutrofilima, TNA (eng. *platelet-neutrophil aggregates, PNA*) u ukupnoj populaciji neutrofila određivani su u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja agonista. Heterotipski agregati trombocita određivani su korišćenjem antihumanih anti-CD61, anti-CD11b i anti-CD14 antitela, obeleženih fluorescentnim bojama, primenom protočne citometrije. U eksperimentalnom radu korišćen je protočni citometar FACSCalibur, proizvođača BD Biosciences (SAD) sa integralnim CellQuest softverom za analizu dobijenih podataka.

Agregati trombocita sa monocitima i neutrofilima određivani su korišćenjem pune krvi ispitanika po prethodno opisanim metodama (58, 161) Alikvoti pune krvi ispitanika (65  $\mu$ L) su odmah nakon venepunkcije ili nakon inkubacije sa određenim agensima, obeleženi anti-CD61-FITC, anti-CD11b-PE i/ili anti-CD14-PerCP antitelima (5  $\mu$ L) i odmah nakon toga tretirani rastvorima agonista, ADP-om u finalnim koncentracijama od 0,5  $\mu$ M i/ili 20  $\mu$ M i/ili natrijum-arahidonatom u finalnoj koncentraciji od 250 $\mu$ g/mL. Alikvoti pune krvi obeleženi antitelima, bez dodatka agonista a uz dodatak iste zapremine HTP-a, korišćeni su za određivanje heterotipskih agregata u bazalnim uslovima. Nakon dodavanja agonista ili HTP-a uzorci su inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon završene inkubacije uzorci su lizirani dodatkom CellLysing rastvora (1mL), inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku, ispirani dva puta rastvorom HTP-a, fiksirani CellFix rastvora (350  $\mu$ L), inkubirani nakon toga 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi i odmah analizirani na protočnom citometriju. Antihumana IgG1-FITC, IgG2-PE i IgG2-FITC antitela korišćena su kao izotipske kontrole za određivanje nespecifičnog vezivanja antitela. Optimalne zapremine korišćenih antitela određene su titracijom u okviru preliminarnih eksperimenata, korišćenjem krvi 3 ispitanika sa metaboličkim sindromom.

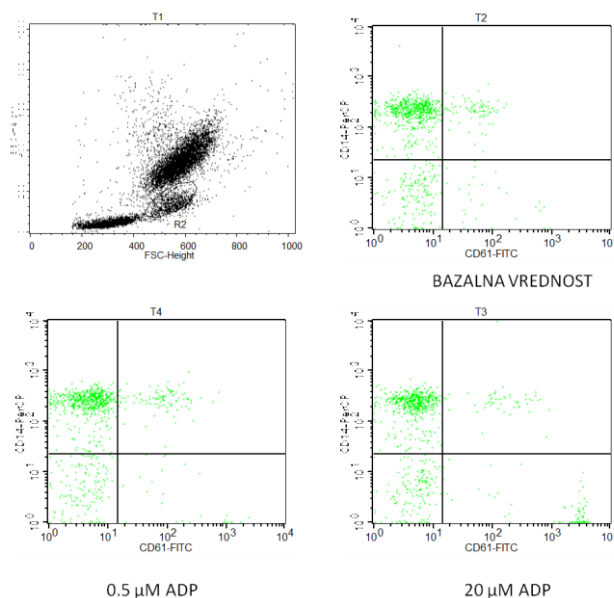


Monociti i neutrofilii su identifikovani na osnovu specifičnih karakteristika u pogledu veličine i granularnosti koje rezultuje karakterističnim položajem na FSC/SSC dijagramu

U populaciji ćelija na FSC/SSC dijagramu koja po karakteristikama odgovara monocitima procenat agregata trombocita i monocita određivan je na osnovu relativne zastupljenosti (%) CD61+CD14+ događaja u ukupnoj populaciji monocita (CD14+ događaja). Analiza procenta agregata trombocita i monocita analizirana je u ukupnoj populaciji od 1000 monocita (CD14+ događaja).

U populaciji na FSC/SSC dijagramu koja po karakteristikama odgovara neutrofilima procenat agregata trombocita i neutrofilima određivan je na osnovu relativne zastupljenosti (%) CD61+CD11b+ događaji u ukupnoj populaciji neutrofila (CD11b+ događaja). Analiza procenta agregata trombocita i neutrofila analizirana je u ukupnoj populaciji od najmanje 10000 neutrofila (CD11b+ događaja).

Reprezentativni CD61-FITC/CD14-PerCP i CD61-FITC/CD11b-PE u ukupnim populacijama monocita i neutrofila prikazanih na FSC/SSC dijagramu u nestimulisanim uzorcima, uzorcima stimulisanim suboptimalnom i optimalnom koncentracijom ADP prikazani su na slikama 8 i 9.



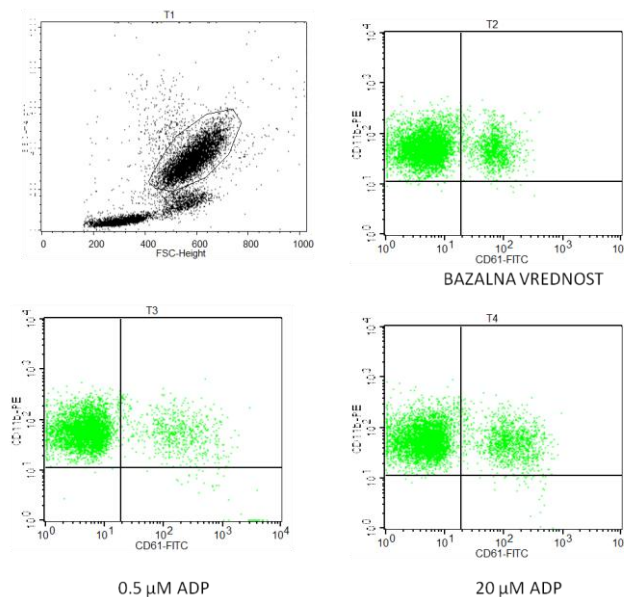
Slika 8. Reprezentativni FSC/SSC dijagram populacije monocita (n= 1000) (a) i CD61-FITC/CD14-PerCP dijagrami u bazalnim uslovima (b) i nakon delovanja 0,5 μM ADP (c) i 20 μM ADP (d).

### Određivanje agregacije trombocita sa neutrofilima i monocitima - *in vitro*

U ispitivanju delovanja analiziranih ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke, kao i delovanja sulforafan-cistein-glicina, kvercetin-3-glukuronida, 3-O-metil-kvercetin-3-glukuronida i kvercetin-3'-sulfata u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, puna krv tretirana je ispitivanim ekstraktima (200 µg/mL) i metabolitima (40 µM), odnosno rastvorom acetil-salicilne kiseline (56 µg/mL) na isti način kao i uzorci razblažene krvi pri analizi markera aktivacije trombocita. Nakon inkubacije 65 µL krvi tretirane ispitivanim ekstraktima i metabolitima, DMSO-om i acetil-salicilnom kiselinom obeleženo je anti-CD61-FITC, anti-CD11b-PE i anti-CD14-PerCP antitelima i tretirano rastvorom natrijum-arahidonata, kao agonista aktivacije trombocita, u finalnoj koncentraciji od 250 µg/mL. Dalje su uzorci procesuirani na način kako je to prethodno opisano (Odeljak 3.2.7.3).

### Određivanje markera aktivacije trombocita u okviru dijetarnih interventnih studija

U okviru dijetarnih interventnih studija markeri aktivacije trombocita određivani su u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja agonista, po prethodno opisanoj metodi (Odeljak 3.2.7.3).



Slika 9. Reprezentativni FSC/SSC dijagram populacije neutrofila ( $n = \text{min.}10000$ ) (a) i CD61-FITC/CD11b-PE dijagrami u bazalnim uslovima (b) i nakon delovanja 0,5 µM ADP (c) i 20 µM ADP (d).

Ukratko, u studiji delovanja soka od aronije agregacija trombocita i leukocita određivana je pre i posle intervencije sokom od aronije, sa ili bez *in vitro* delovanja acetil-salicilne kiseline, u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja agonista, arahidonske kiseline (250 $\mu$ g/mL) i ADP-a (0,5 $\mu$ M).

U studiji delovanja infuza koprive, mirođije i šarplaninskog čaja agregacija trombocita i leukocita određivana je pre i posle intervencije, sa ili bez *in vitro* delovanja acetil-salicilne kiseline u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja agonista, arahidonske kiseline (250 $\mu$ g/mL) i ADP-a (0,5 $\mu$ M i 20  $\mu$ M).

U studiji delovanja soka od nara agregacija trombocita i leukocita određivana je pre i posle intervencije, u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja ADP-a kao agonista, u koncentracijama od 0,5 $\mu$ M i 20  $\mu$ M.

### 3.2.8. Određivanje adhezije trombocita i endotelnih ćelija u kulturi

Adhezija trombocita i endotelnih ćelija u kulturi u *ex vivo* eksperimentalnim uslovima određivana je primenom adhezionog eseja po metodi Karpatkin-a i saradnika (162), modifikovanoj po metodi Zec i saradnika (163). Kao model endotelnih ćelija korišćene su EA.hy926 ćelije gajene u kulturi. Površina bazena tamnih mikroploča sa 96 bazena (Thermo Scientific, Finland) oblagana je suspenzijom trombocita (100  $\mu$ L,  $1 \times 10^8$ /mL u HTP-u) izolovanih iz pune krvi ispitanika pre i nakon dijetarne intervencije. Mikroploče su inkubirane 24h na temperaturi od +4°C. Nakon inkubacije neadherirani trombociti su uklonjeni ispiranjem rastvorom BSA u PBS-u (1%). Isti rastvor (200  $\mu$ L po bazenu), nakon ispiranja, korišćen je za blokiranje „slobodne“ adherentne površine u bazenima inkubacijom u trajanju od 1h na 37°C. Nakon tripsinizacije EA.hy926 ćelije su resuspendovane u HTP-u uz dodatak CaCl<sub>2</sub> (0.9mM) and MgCl<sub>2</sub> (0.9mM) i obojene rastvorom kalceina-AM . Sto mikrolitara suspenzije obojenih EA.hy926 ćelija ( $1 \times 10^6$ /mL) dodato je u bazene obložene trombocitima u prisustvu rastvora trombina (2 U mL<sup>-1</sup>) i inkubirano 1h na 37°C. Nakon inkubacije bazeni su ispirani (2x) rastvorom BSA u PBS-u (1%) i fluorescencija, srazmerna broju endotelnih ćelija adheriranih za trombocite, merena je na čitaču fluorescencije mikroploča (Florosken Ascent FL, Thermo) pri talasnoj dužini ekscitacije od 485 nm i talasnoj dužini emisije od 520 nm. Rezultati su izraženi kao procenat inhibicije adhezije endotelnih ćelija za trombocite nakon dijetarne intervencije u odnosu na adheziju pre dijetarne intervencije, na osnovu izmerenih fluorescencija. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost dva određivanja.

### **3.2.9. Određivanje agregacije trombocita i malignih ćelija u kulturi**

Heterotipska agregacije trombocita i malignih ćelija primenom protočne citometrije određivana je po modifikovanoj metodi Wang-a i saradnika (164). Ukratko, izolovani trombociti, prethodno tretirani ispitivanim ekstraktima (200 µg/mL) ili DMSO-om kao kontrolom, obeleženi su CD61-PerCP antitelom i inkubirani sa HeLa ćelijama prethodno obeleženim kalceinom (30 min, 37°C), u prisustvi niske koncentracije trombina (0,02 IU/ml). Nakon inkubacije, suspenzija je razblažena u HTP puferu i nastali mikro-agregati analizirani su primenom protočne citometrije. Agregacija trombocita i malignih ćelija u tretiranim i kontrolnim uzorcima određivana je kao procenat trombocita vezanih za maligne ćelije (CD61+kalcein+ događaja) u ukupnoj populaciji trombocita (CD61+događaji; n= 10 000).

### **3.2.10. Određivanje biohemijskih parametara i krvne slike**

Definisani biohemijski parametri određivani su na kliničkom biohemijskom analizatoru Cobas e411, proizvođača Roche Diagnostics (Basel, Švajcarska) i upotrebom komercijalnih kompleta serije Roche Diagnostics, u skladu sa uputstvima proizvođača. Parametri krvne slike određivani su na hematološkom analizatoru Coulter Ac.T Diff, proizvođača Beckman Coulter (SAD).

### **3.2.11. Određivanje antropometrijskih parametara i vrednosti krvnog pritiska**

Analizirani antropometrijski parametri obuhvatali su visinu, telesnu masu i obim struka.

Telesna masa (kg) ispitanika merena je na profesionalnom analizatoru telesne konstitucije Tanita SC331S, proizvođača Tanita (SAD).

Vrednosti indeksa telesne mase (ITM) izračunavane su na osnovu visine i težine prema obrascu:  $ITM = \text{težina (kg)} / (\text{visina(m)})^2$ .

Vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska merene su profesionalnim automatskim oscilometrijskim sfingmomanometrom HEM-907XL, proizvođača Omron (SAD), izražavane u milimetrima živinog stuba (mm Hg) i predstavljene kao srednja vrednost najmanje dva merenja u periodu od najmanje 30 minuta.

### 3.2.12. Statistička obrada podataka

U obradi i analizi dobijenih podataka korišćene su sledeće statističke metode:

- deskriptivna statistika za opis podataka: srednja vrednost ( $\bar{X}$ ), medijana (MD), standardna devijacija (SD), interkvartilni raspon (IR), minimum (Min), maksimum (Max)
- $\chi^2$  test za anлізу kategoričkih podataka, prikazanih kao apsolutne frekvence
- Šapiro-Vilk (eng. Shapiro-Wilk) test za ispitivanje normalne distribucije podataka
- Levenov test jednakosti varijanse za procenu jednakosti varijanse između grupa
- Student t-test za ispitivanje razlika između dve grupe podataka (za parametre koji pokazuju normalnu distribuciju)
- jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) za analizu više grupa normalno distribuiranih podataka koji zadovoljavaju uslove primene ANOVA (post hoc Bonefroni kriterijum)
- Vilkoksonov test označenih rangova (eng. Wilcoxon signed ranks test) za analizu dve grupe podataka koji su rezultat ponovljenih merenja (ne-parametarska analiza)
- Man-Vitnjev U test (eng. Mann-Whitney U test) za analizu dve nezavisne grupe podataka (ne-parametarska analiza)
- Fridmanova ANOVA (eng. Friedman ANOVA) za analizu više grupa podataka koji ne zadovoljavaju uslove za primenu parametarskog ANOVA testa (ne-parametarska analiza)
- Spirmanov (eng. Spearman) koeficijent korelacije za utvrđivanje povezanosti između grupa podataka koji ne slede normalnu raspodelu

Podaci koji nisu normalno distribuirani prikazani su grafički Tukijevim (eng. Tukey) „box and whisker“ dijagramima, na kojima je horizontalnom linijom prikazama medijana, pravougaonikom interkvartilni raspon, vertikalnim linijama minimum i maksimum, osim u slučaju kada su identifikovani podaci koji odstupaju više od  $1,5 \times IR$  od vrednosti kojima se definiše interkvartilni raspon („outlayer“), koji su prikazane kružićima, a horizontalne linije povezuju podatke sa maksimalnim i minimalnim vrednosti izuzimajući odstupajuće podatke.

Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je definisan p-vrednošću (nivoom značajnosti) manjom ili jednakom 0,05.

### 3.3. DIZAJN DIJETARNIH INTERVENTNIH STUDIJA

#### **3.3.1. Ispitivanje delovanja jednokratne konzumacije soka od aronije na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima**

Studija je dizajnirana kao nekontrolisana pilot studija na zdravim ispitanicima.

##### 3.3.1.1. Ispitanici

Grupu ispitanika činilo je 20 zdravih, nekojinskih osoba oba pola, nepušača, starosti između 18 i 35 godina. Zdravstveni status ispitanika procenjen je na osnovu anamnestičkih podataka. Kriterijum za uključivanje podrazumevao je i poštovanje dijetarnih restrikcija definisanih protokolom studije. Dijetarne restrikcije odnosile su se na ograničeno konzumiranje namirnica za koje je, na osnovu naučnih literaturnih podataka, pokazano da ispoljavaju efekte na funkciju trombocita, u periodu od 14 dana pre dijetarne intervencije, i njihovo potpuno isključenje iz ishrane u periodu od 48h pre intervencije. Lista namirnica obuhvatala je jagodasto i bobičasto voće, paradajz, čokoladu i kakao, jezgrasto voće, kivi, crveno vino, kafu, crni i zeleni čaj, crveni grejfrut, crveni kupus, crveni luk, crveni pasulj i masnu ribu. Ispunjavanje ovog kriterijuma procenjeno je na osnovu Dnevnika ishrane. Dijetarne restrikcije u pripremnom periodu sprovedene su sa ciljem: 1) smanjenja uticaja dijetarnih faktora na funkciju trombocita; 2) uravnoteženje varijacija u ishrani koje bi eventualno mogle da maskiraju efekte same intervencije. Ispitanici nisu konzumirali hranu i piće (osim vode) najmanje 12 h pre dijetarne intervencije.

##### 3.3.1.2. Protokol

U skladu sa protokolom, na dan sprovođenja dijetarne intervencije, ispitanicima je po dolasku u eksperimentalnu laboratoriju (8h) izmerena vrednost krvnog pritiska i određeni definisani antropometrijski parametri. Nakon 20 minuta potpunog mirovanja uzorkovana je puna krv, sa i bez dodatka odgovarajućih antiokoagulansa. Odmah nakon venepunkcije ispitanici su konzumirali 150 mL komercijalnog matičnog soka od aronije (Nutrika doo, Srbija). Venepunkcija je ponovljena 2h nakon konzumacije soka od aronije.

U uzorcima krvi dobijenim venepunkcijom pre dijetarne intervencije određeni su osnovni biohemijski i hematološki parametri.

U uzorcima pune krvi dobijenim pre i posle intervencije određena je ekspresija P-selektina, kao markera aktivacije trombocita, kao i procenat TMA u populaciji monocita i TNA u populaciji neutrofila, kao markera heterotipske agregacije trombocita. Navedeni parametri određivani su u bazalnom stanju, kao i nakon delovanja ADP-a suboptimalne koncentracije od 0,5mM i arahidonske kiseline (AK), koncentracije 250 µg/mL, u *ex vivo* eksperimentalnim uslovima.

Trombociti izolovani iz pune krvi dobijene venepunkcijom 8 nasumično izabranih ispitanika, pre i posle dijetarne intervencije u okviru ispitivanja delovanja jednokratne konzumacije soka od aronije, korišćeni su u ispitivanju delovanja soka od aronije na adheziju trombocita i endotelnih ćelija u kulturi, u *ex vivo* eksperimentalnim uslovima.

### **3.3.2. Ispitivanje delovanja jednokratne konzumacije čaja od koprive, čaja od mirođije i šarplaninskog čaja na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima**

Studija je dizajnirana kao kontrolisana, randomizirana, jednostruko slepa studija jednokratne dijetarne intervencije, sa četiri paralelne grupe ispitanika, odnosno četiri interventna uzorka, infuza koprive, infuza mirođije, infuza šarplaninskog čaja kao interventnih proizvoda i tople vode, kao komparativnog uzorka.

#### 3.3.2.1. Ispitanici

Grupu ispitanika činilo je 80 osoba sa metaboličkim sindromom, oba pola, starosti između 35 i 65 godina. Metabolički sindrom, kao kriterijum za uključivanje u studiju, definisan je na osnovu NCEP ATP III kriterijuma (165), kao prisustvo tri ili više navedenih faktora rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti:

- abdominalna gojaznost (obim struka veći od 102 cm kod muškaraca i 88 cm kod žena)
- nivo triglicerida u serumu jednak ili veći od 1,7 mmol/L (150 mg/dL)
- nivo HDL holesterola u serumu manji od 1,03 mmol/L (40 mg/dL) kod muškaraca i 1,29 mmol/L (50 mg/dL) kod žena
- vrednosti sistolnog/dijastolnog krvnog pritiska jednake ili veće od 130/85 mm Hg (tokom najmanje 2 ponovljena merenja)
- nivo glukoze u serumu, na tašte, jednak ili veći od 5,6 mmol/L (100 mg/dL)

Kriterijumi za neuključivanje u studiju podrazumevali su:

- pušenje
- vrednosti sistolnog/dijastolnog krvnog pritiska manje od 130/85 mm Hg ili veće od (tokom najmanje 2 ponovljena merenja)
- dijagnozu kardiovaskularnih bolesti (koronarna bolest, atero-tromboza, šlog)
- dijagnozu dijabetes melitusa tip I ili II
- terapija farmakološki aktivnim supstancama sa dokazanim efektima na trombocite (aspirin, ne-steroidni antiinflamatorni lekovi, statini)

U preliminarnoj fazi studije procenjen je zdravstveni status ispitanika na osnovu anamnestičkih podataka i određeni osnovni biohemijski i antropometrijski parametri definisani kriterijumima za uključivanje. Kriterijumi za uključivanje podrazumevali su i pristanak na poštovanje dijetarnih restrikcija definisanih protokolom studije (objašnjenih detaljno u odeljku 3.3.1.1 Ispitanici), uključujući i biljke čije je delovanje ispitivano. Ispitanici koji su zadovoljili sve kriterijume za uključivanje, odnosno neuključivanje u studiju, regrutovani su za učešće u studiji i nasumično podeljeni u četiri interventne grupe. Dijetarnoj intervenciji prethodio je pripremni period dijetarnih restrikcija.

#### 3.3.2.2. Protokol

Na dan sprovođenja dijetarne intervencije ispitanicima je po dolasku i nakon 20 minuta potpunog mirovanja, uzorkovana puna krv, sa i bez dodatka odgovarajućih antiokoagulansa. Odmah nakon venepunkcije ispitanici su konzumirali 200 ml sveže pripremljenih čajeva od koprive, mirođije ili šarplaninskog čaja, na način opisan u odeljku 3.1.2.4, ili 200 ml tople vode. Venepunkcija je ponovljena 2h nakon konzumacije.

U uzorcima pune krvi dobijenim pre dijetarne intervencije određeni su osnovni biohemijski i hematološki parametri.

U uzorcima pune krvi dobijenim pre i posle intervencije određena je ekspresija P-selektina i GPIIb-IIIa, kao markera aktivacije trombocita, kao i procenat TMA u populaciji monocita i TNA u populaciji neutrofila, kao markera heterotipske agregacije trombocita. Navedeni parametri određivani su u bazalnom stanju, kao i nakon delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije ADP-a (0,5mM i 20 mM) i delovanja AA (250 µg/mL), u *ex vivo* eksperimentalnim uslovima.



### **3.3.3. Ispitivanje delovanja jednokratne konzumacije soka od nara na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima**

Studija je dizajnirana kao kontrolisana, randomizirana, jednostruko slepa studija jednokratne dijetarne intervencije, sa dve paralelne grupe ispitanika, odnosno dva interventna uzorka, soka od nara, kao intereventnog uzorka i vode, kao komparativnog odnosno kontrolnog uzorka.

#### 3.3.3.1. Ispitanici

Grupu ispitanika činilo je 40 osoba sa metaboličkim sindromom, oba pola, starosti između 35 i 65 godina. Kriterijumi za uključivanje i neuključivanje u studiju bili su identični sa kriterijumima definisanim u okviru studije ispitivanja delovanja jednokratne konzumacije infuza herbe koprive, mirođije i šarplaninskog čaja na funkciju trombocita i opisani su detaljno u odeljku 3.3.2.1. Ispitanici.

#### 3.3.3.2. Protokol

Protokol izvođenja studije na dan intervencije bio je identičan protokolu studije delovanja infuza tradicionalnih biljaka (detaljno opisan u odeljku 3.3.2.2. Protokol), sa izmenama u pogledu interventnog materijala. Nakon prvog uzorkovanja krvi ispitanici su konzumirali 300 mL komercijalnog matičnog soka od nara, kao interventnog proizvoda ili 300 ml vode kao komparativnog uzorka, a 2h nakon konzumiranja uzorkovanje krvi je ponovljeno.

U uzorcima krvi dobijenim venepunkcijom pre dijetarne intervencije određeni su osnovni biohemijski i hematološki parametri.

U uzorcima pune krvi dobijenim pre i posle intervencije određena je ekspresija P-selektina i GPIIb-IIIa, kao markera aktivacije trombocita, kao i procenat TMA u populaciji monocita i TNA u populaciji neutrofila, kao markera heterotipske agregacije trombocita. Navedeni parametri određivani su u bazalnom stanju, kao i nakon delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije ADP-a (0,5mM i 20 mM), u ex vivo eksperimentalnim uslovima.

Puna krv dobijena venepunkcijom 6 zdravih ispitanika u okviru studije ispitivanja delovanja jednokratne konzumacije soka od aronije i 6 ispitanika sa metaboličkim sindromom u okviru studije ispitivanja delovanja jednokratne konzumacije infuza herbe koprive, mirođije i šarplaninskog čaja korišćena je za ispitivanje delovanja analiziranih ekstrakata na funkciju trombocita i ispitivanje

antioksidativne aktivnosti na eritrocite i trombocite u *in vitro* eksperimentalnim uslovima.

Delovanje dve frakcije etanolnog ekstrakta aronije, F1 i F2, na markere aktivacije trombocita u *in vitro* eksperimentalnim uslovima ispitivana je u uzorcima krvi 4 ispitanika sa metaboličkim sindromom.

Sve osobe koje su učestvovala u navedenim studijama pismeno su upoznate sa ciljevima i protokolom istraživanja i potpisale su pristanak za učešće u istraživanju. Studije su sprovedene u skladu sa principima i smernicama Dobre kliničke prakse u kliničkim ispitivanjima. Studija delovanja jednokratne konzumacije soka od aronije na funkciju trombocita odobrena je od strane Etičkog odbora Opšte bolnice u Leskovcu (Odluka br. 8716). Studija delovanja jednokratne konzumacije infuza koprive, mirođije i šarplaninskog čaja na funkciju trombocita i studija delovanja jednokratne konzumacije soka od nara na funkciju trombocita odobrene su od strane Etičkog odbora Kliničko-bolničkog centra Zemun (Odluka br. 833).

## 4.1. HEMIJSKA ISPITIVANJA

U okviru preliminarnih ispitivanja, koja su prethodila ispitivanjima biološke aktivnosti, određen je hemijski sastav uzoraka, koji se odnosio na sadržaj ukupnih fenola, sadržaj antocijana kao klase polifenola karakterističan za jagodasto i bobičasto voće, kao i parametri kvaliteta sokova definisani važećim pravilnikom o kvalitetu voća i proizvoda od voća. Dodatno je u sklopu hemijskih ispitivanja analizirana i antiradikalska aktivnost uzoraka, kao jedan od mehanizama njihove antioksidativne aktivnosti, primenom hemijskih metoda.

### 4.1.1. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim suvim ekstraktima, sokovima i čajevima

Polifenoli predstavljaju sekundarne metabolite biljaka sa povoljnim efektima na zdravlje ljudi. Mnoge namirnice biljnog porekla predstavljaju dobar izvor polifenola i njihova konzumacija doprinosi dnevnom unosu ovih biološki aktivnih sastojaka.

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim uzorcima određivan je spektrofotometrijski na bazi bojene reakcije sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom. Apsorbancija je merena na 765 nm, a sadržaj ukupnih fenola je izračunat iz kalibracione krive za galnu kiselinu. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost dva ponavljanja  $\pm$  standardna devijacija.

**Tabela 7.** Sadržaj ukupnih fenola u suvim metanolnim ekstraktima ispitivanih biljaka

Ispitivani uzorci	Ukupni fenoli (mg GAE/g)
Ekstrakt koprive	69,44 $\pm$ 0,03
Ekstrakt mirođije	58,07 $\pm$ 0,11
Ekstrakt šarplaninskog čaja	156,66 $\pm$ 0,01
Ekstrakt kelja	42,60 $\pm$ 0,06
Ekstrakt nara	45,50 $\pm$ 0,02
Ekstrakt japanske jabuke	5,62 $\pm$ 0,45

GAE- ekvivalenti galne kiseline

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanom suvom etanolno-vodenom ekstraktu aronije iznosio je  $17,12 \pm 0,18$  mg GAE/g.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da sve analizirane biljke predstavljaju dobar izvor fenolnih jedinjenja. Najveći sadržaj ukupnih fenola detektovan je u suvom ekstraktu šarplaninskog čaja (156,66 mg GAE/g), a zatim po sadržaju ukupnih fenola slede ekstrakt koprive (69,44 mg GAE/g), mirođije (58,07 mg GAE/g), ekstrakt kelja (42,60 mg GAE/g) i ekstrakt nara (45,50 mg GAE/g) koji su bili istog reda veličine. Znatno niži sadržaj ukupnih fenola detektovan je u ekstraktu japanske jabuke (5,62 mg GAE/g ) i bio je oko 10 puta niži u odnosu na sadržaj većine analiziranih ekstrakata.

**Tabela 8.** Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim sokovima od voća

<b>Ispitivani uzorci</b>	<b>Ukupni fenoli (mg GAE/100 mL)</b>
Sok od maline	$164,4 \pm 5,1$
Sok od crne maline	$240,2 \pm 5,3$
Sok od crvene ribizle	$260,3 \pm 4,0$
Sok od crne ribizle	$133,0 \pm 2,1$
Sok od borovnice	$236,3 \pm 7,0$
Sok od samoniklog nara	$373,8 \pm 7,3$
Sok od aronije	$593,7 \pm 3,3$

GAE- ekvivalenti galne kiseline

Značajno veći sadržaj ukupnih fenola u odnosu na ostale sokove imao je sok od aronije, koji je iznosio  $593,7 \pm 3,3$  mg GAE na 100 mL soka.

Sadržaj ukupnih fenola u komercijalnim sokovima od aronije i nara od prikazan je u Tabeli 9. Sadržaj ukupnih polifenola u svežem soku od aronije, dobijenom ceđenjem zrelih plodova od kojih je dobijen i komercijalni sok, nije se značajno razlikovao od sadržaja u komercijalnom soku, ukazujući da procesi uključeni u proces proizvodnje komercijalnog soka (tretman pektinazom, mehaničko ceđenje, kratkotrajna pasterizacija) ne utiču značajno na sadržaj ukupnih polifenola.

**Tabela 9.** Sadržaj ukupnih fenola u komercijalnim sokovima od aronije i nara

<b>Ispitivani uzorci</b>	<b>Ukupni fenoli (mg GAE/100mL)</b>
Komercijalni sok aronije	586,7 ± 3,3
Komercijalni sok od nara	293,8 ± 11,3

GAE- ekvivalenti galne kiseline

**Tabela 10.** Sadržaj ukupnih fenola u čajevima od koprive, mirođije i šarplaninskom čaju

<b>Ispitivani uzorci</b>	<b>Ukupni fenoli (mg GAE/100 mL)</b>
Čaj od koprive	47,4 ± 2,1
Čaj od mirođije	38,2 ± 1,3
Šarplaninski čaj	32,3 ± 2,7

GAE- ekvivalenti galne kiseline

Na osnovu dobijenih podataka može se zaključiti da čaj od koprive ima najviši sadržaj ukupnih fenola. Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim čajevima bio je u saglasnosti sa literaturnim podacima (166, 167). Generalno se može zaključiti da pri konzumaciji istih zapremina, ispitivani čajevi značajno manje doprinose dijetarnom unosu ukupnih fenola u odnosu na analizirane sokove.

#### **4.1.2. Sadržaj ukupnih antocijana u ekstraktima aronije i nara i ispitivanim sokovima od voća**

Antocijani predstavljaju jednu od klasa polifenola prisutnih u namirnicama biljnog porekla, sa brojnim biološkim efektima na zdravlje ljudi. U svežim namirnicama nalaze se uglavnom u monomernoj formi. Stajanjem i delovanjem termičkih tretmana dolazi do prelaska monomernih u polimerne oblike.

Sadržaj monomernih antocijana u ispitivanim uzorcima određivan je pH diferencijalnom metodom, na osnovu apsorpcije rastvora uzorka u puferima pH 4,5 i pH 7, merene na 450 nm. Rezultati su izraženi kao sadržaj ekvivalenata cijanidin-3-glukozida u mg/mL ispitivanih sokova ili mg/g ispitivanih ekstrakata.

U cilju procene delovanja pojedinih grupa polifenola u biološkim sistemima, vodeno-etanolni ekstrakt aronije je frakcionisan, re-ekstrakcijom vodom i

metanolom. Sadržaj antocijana u ovako dobijenim frakcijama ekstrakta aronije, kao i u ekstraktu nara, prikazan je u Tabeli 11.

**Tabela 11.** Sadržaj antocijana u suvom metanolnom ekstraktu nara i frakcijama suvog vodeno-etanolnog ekstrakta aronije

<b>Ispitivani uzorci</b>	<b>Monomerni antocijani (mg CGE/g)</b>
Ekstrakt nara	0.112 ± 0.01
Ekstrakt aronije (F1)	0.021±0.004
Ekstrakt aronije (F2)	0.206 ± 0.01

CGE- ekvivalenti cijanidin-3-glukozida

**Tabela 12.** Sadržaj monomernih antocijana u sokovima od voća dobijenim ceđenjem svežih plodova

<b>Ispitivani uzorci</b>	<b>Monomerni antocijani (mg CGE/100 mL)</b>
Sok od maline	164,4 ± 5,1
Sok od crne maline	240,2 ± 5,3
Sok od crvene ribizle	260,3 ± 4,0
Sok od crne ribizle	133,0 ± 2,1
Sok od borovnice	236,3 ± 7.0
Sok od samoniklog nara	193,8 ± 7,3
Sok od aronije	218,4 ± 4,3

CGE- ekvivalenti cijanidin-3-glukozida

**Tabela 13.** Sadržaj antocijana u komercijalnim sokovima od aronije i nara

<b>Ispitivani uzorci</b>	<b>Monomerni antocijani (mg GAE/100ml)</b>
Komercijalni sok od aronije	15,3 ± 0,2
Komercijalni sok od nara	1,7 ± 0,1

CGE- ekvivalenti cijanidin-3-glukozida

#### 4.1.3. Rastvorljiva suva materija, ukupna kiselost i pH vrednost sokova

Kao parametri kvaliteta ispitivanih sokova određeni su rastvorljiva suva materija, ukupna kiselost i pH vrednost ispitivanih sokova. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 14.

**Tabela 14.** Ukupna i rastvorljiva suva materija u ispitivanim sokovima

Ispitivani uzorci	Rastvorljiva suva materija	Ukupna kiselost	pH
Sok od maline	5,9 ± 0,2	1,97 ± 0,02	2,87
Sok od crne maline	7,75 ± 0,3	0,74 ± 0,01	3,81
Sok od crvene ribizle	7,8 ± 0,12	1,83 ± 0,01	2,62
Sok od crne ribizle	12,4 ± 0,1	3,17 ± 0,03	2,96
Sok od borovnice	7,8 ± 0,12	0,75 ± 0,01	3,04
Sok od samoniklog nara	12,7 ± 0,22	2,97 ± 0,01	3,27
Sok od aronije	14,2 ± 0,2	1,87 ± 0,01	2,99
Komercijalni sok od aronije	13,7 ± 0,2	2,17 ± 0,01	3,10
Komercijalni sok od nara	16,7 ± 0,4	2,27 ± 0,01	3,12

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su svi parametri odgovarali zahtevima definisanim važećim pravilnicima (150, 151).

U industriji hrane analizirani parametri imaju višestruki značaj. Vrednost analiziranih parametara ukazuje na stepen zrelosti voća u periodu branja. Istovremeno, nizak odnos rastvorljive suve materije, koja uglavnom reflektuje sadržaj ukupnih šećera, i kiselosti ukazuje na manje prihvatljive senzorne karakteristike sokova, mada visok stepen kiselosti ujedno predstavlja povoljnu tehnološku karakteristiku plodova i sokova kao sirovina za dalju proizvodnju, jer ukazuje na mogućnost očuvanja kvaliteta tokom dužeg skladištenja.

U okviru ove disertacije dobijene vrednosti kiselosti analizirane su u pogledu uticaja na biološku aktivnost navedenih uzoraka, u okviru *in vitro* eksperimenata.

#### 4.1.4. Antiradikalska aktivnost ispitivanih suvih ekstrakata, čajeva i sokova

Antiradikalska aktivnost uzoraka ispitivana je DPPH testom, na osnovu sposobnosti neutralizacije DPPH radikala. DPPH test je jedan od najčešće primenjivanih antioksidantnih testova za procenu sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala.

**Tabela 15.** Sposobnost suvih ekstrakata da neutrališu DPPH radikal

<b>Ekstrakti</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>
Ekstrakt koprive	43,59 ± 0,1
Ekstrakt mirođije	43,7 ± 0,1
Ekstrakt šarplaninskog čaja	10,06 ± 0,1
Ekstrakt kelja	94,76 ± 0,3
Ekstrakt nara	87,54 ± 0,2
Ekstrakt japanske jabuke	249,75 ± 0,4

Dobijene vrednosti pokazuju statistički značajnu korelaciju sa sadržajem ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima ( $r = -1$ ,  $p < 0,0005$ )

**Tabela 16.** Sposobnost frakcija etanolno-vodenog ekstrakta aronije da neutrališu DPPH radikal

<b>Ekstrakti</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>
Ekstrakt aronije (F1)	7,41 ± 0,019
Ekstrakt aronije (F2)	4,12 ± 0,023

**Tabela 17.** Sposobnost komercijalnih sokova da neutrališu DPPH radikal

<b>Sokovi</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>
Komercijalni sok aronije	0,44±0,03
Komercijalni sok od nara	1.00±0,03



**Tabela 18.** Sposobnost sveže ceđenih sokova da neutrališu DPPH radikal

<b>Sokovi</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>
Sok od maline	2,40 ± 0,21
Sok od crne maline	1,28 ± 0,09
Sok od crvene ribizle	3,14 ± 0,23
Sok od crne ribizle	0,91 ± 0,07
Sok od borovnice	1,68 ± 0,13
Sok od samoniklog nara	0,71 ± 0,07
Sok od aronije	0,52 ± 0,03

**Tabela 19.** Sposobnost ispitivanih čajeva da neutrališu DPPH radikal

<b>Ispitivani uzorci</b>	<b>EC<sub>50</sub> (µg/ ml)</b>
Čaj od koprive	86,0± 1,2
Čaj od mirođije	111,0 ± 1,4
Šarplaninski čaj	194,4 ± 2.0

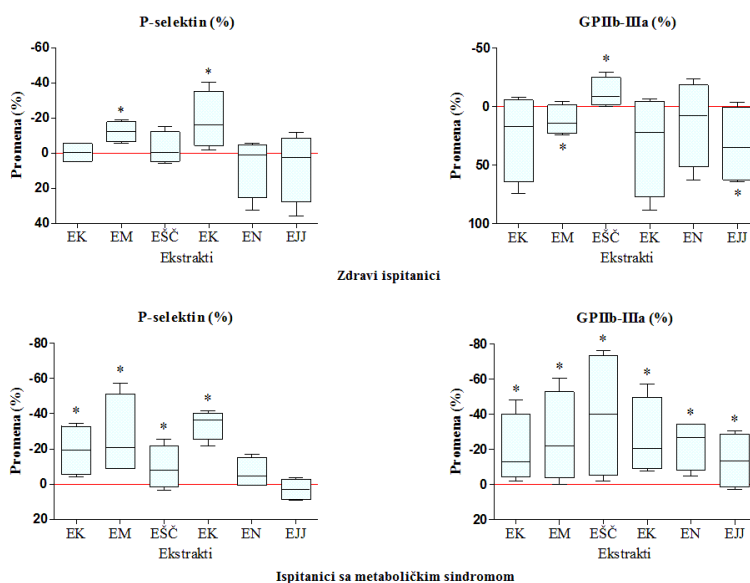
Direktno antioksidativno delovanje ispitivanih uzoraka, procenjeno na osnovu inhibicije DPPH radikala, generalno koreliše sa sadržajem ukupnih fenola i potvrđuje značajnu ulogu polifenola kao dijetarnih antioksidanasa. Značaj direktnog antioksidativnog delovanja ekstrakata i namirnica bogatih polifenolima nakon dijetarnog unosa u prevenciji kardiovaskularnih i drugih hroničnih bolesti nije potvrđen (80). Istovremeno, antioksidativno delovanje polifenola usmereno na druge sastojke namirnica u sklopu hrane koja se konzumira i unutar digestivnog trakta, kao i uticaj ovog delovanja na postprandijalni fiziološki odgovor organizma, još uvek nije potpuno proučen.

## 4.2. UTICAJ ISPITIVANIH EKSTRAKATA I METABOLITA NA AKTIVACIJU TROMBOCITA I NJIHOVU AGREGACIJU SA MONOCITIMA I NEUTROFILIMA U *IN VITRO* EKSPERIMENTALNIM USLOVIMA

### 4.2.1. Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja kelja, nara, japanske jabuke i aronije na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima

#### *Uticaj ispitivanih ekstrakata na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa*

Kao parametri ekspresije P-selektina i GPIIb-IIIa određivani su procenat P-selektin-pozitivnih i GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita (n=20000) i srednja vrednost gustine P-selektina i GPIIb-IIIa na pojedinačnim trombocitima zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom, kao odgovor na agonističko delovanje arahidonske kiseline.

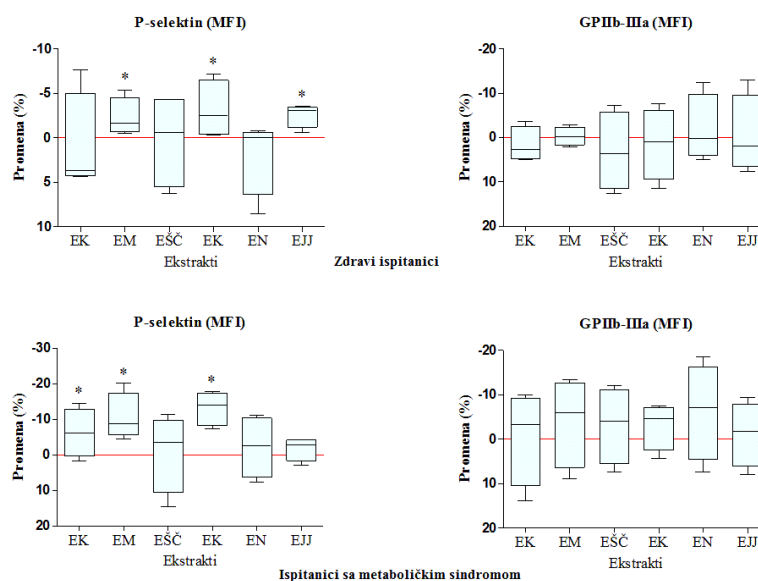


**Slika 10** Uticaj ekstrakata koprive (EK), mirođije (EM), šarplaninskog čaja (EŠČ), kelja (EK), nara (EN) i japanske jabuke (EJJ) na procenat P-selektin i GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u populaciji trombocita (n=20000) zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom, nakon delovanja arahidonske kiseline kao agonista. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om i predstavljeni „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: \* $p < 0.05$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Primenom neparametarskog testa, Vilkoksonov testa označenih rangova, ispitivana je statistički značajna razlika između vrednosti analiziranih parametara

trombocita tretiranih ekstraktima koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke i vrednosti navedenih parametara trombocita tretiranih DMSO-om kao kontrolom, pre delovanja arahidonske kiseline.

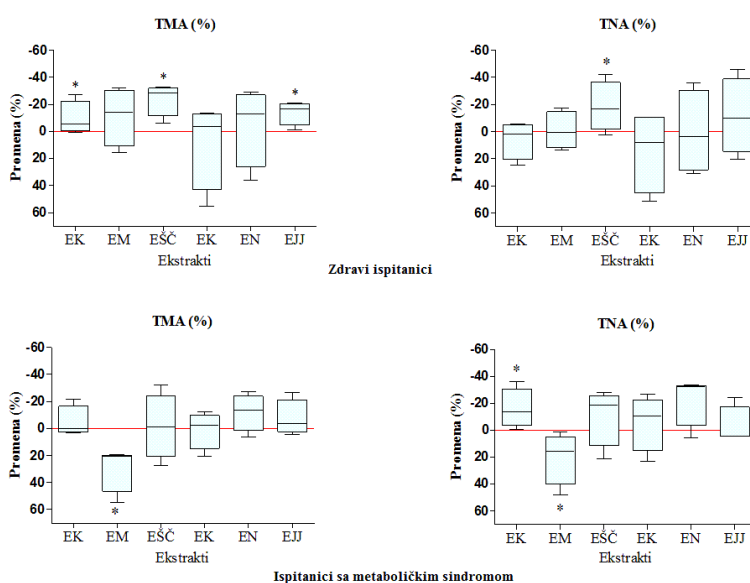
Dobijene vrednosti ekspresije P-selektina i GPIIb-IIIa, izražene kao procenat promene u odnosu na kontrolni uzorak, grafički su prikazani kao Tukijevi „box and whisker“ dijagrami, sa označenom medijanom, interkvartilnim rasponom, minimalnom i maksimalnom vrednošću (Slike 10 i 11).



**Slika 11.** Uticaj ekstrakata koprive (EK), mirođije (EM), šarplaninskog čaja (EŠČ), kelja (EK), nara (EN) i japanske jabuke (EJJ) na prosečnu gustinu P-selektina i GPIIb-IIIa (MFI) na pojedinačnom trombocitu u populaciji trombocita (n=20000) kod ispitanika sa metaboličkim sindromom i zdravih ispitanika, nakon delovanja arahidonske kiseline kao agonista. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om i predstavljeni „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: \* $p < 0.05$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

*Uticaj ispitivanih ekstrakata na agregaciju trombocita sa monocitima i leukocitima*

Kao parametri agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima određivani su procenat agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji monocita i procenat agregata trombocita i neutrofila u ukupnoj populaciji neutrofila zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom, kao odgovor na agonističko delovanje arahidonske kiseline.



**Slika 12.** Uticaj ekstrakata koprive (EK), mirođije (EM), šarplaninskog čaja (EŠČ), kelja (EK), nara (EN) i japanske jabuke (EJJ) na procenat agregata trombocita i monocita (TMA) u populaciji monocita (n = 1000) i procenat agregata trombocita i neutrofila (TNA) u populaciji neutrofila (n = 10000), kod zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom, nakon delovanja arahidonske kiseline kao agonista. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om i predstavljeni „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: \*p<0.05; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Dobijene vrednosti parametara agregacije, izražene kao procenat promene u odnosu na kontrolni uzorak, prikazane su na Slici 12.

Primenom neparametarskog Vilkoksonovog testa označenih rangova ispitivana je statistički značajna razlika između vrednosti analiziranih parametara tretiranih ekstraktima koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke i vrednosti navedenih parametara trombocita tretiranih DMSO-om kao kontrolom, pre delovanja arahidonske kiseline.

Pokazano je da ispitivani ekstrakti statistički značajno utiču na pojedine parametre aktivacije i agregacije trombocita indukovane delovanjem arahidonske kiseline, kod zdravih ispitanika i/ili ispitanika sa metaboličkim sindromom.

Prikaz parametara aktivacije i agregacije trombocita zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom, na kojima je pokazano statistički značajno delovanje ispitivanih ekstrakata, dat je u Tabeli 20.

**Tabela 20.** Uticaj ekstrakata na parametre aktivacije i agregacije trombocita zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom

	<b>Parametri</b>	<b>EK</b>	<b>EM</b>	<b>EŠČ</b>	<b>Eklj</b>	<b>EN</b>	<b>EJJ</b>
<b>Zdravi ispitanici</b>	P-sel (%)		<b>X</b>		<b>X</b>		
	P-sel (MFI)		<b>X</b>		<b>X</b>		<b>X</b>
	GPIIb-IIIa (%)		<b>X</b>	<b>X</b>			<b>X</b>
	GPIIb-IIIa (MFI)						
	TMA (%)	<b>X</b>		<b>X</b>			<b>X</b>
	TNA (%)			<b>X</b>			
<b>Ispitanici sa metaboličkim sindromom</b>	P-sel (%)	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>		
	P-sel (MFI)	<b>X</b>	<b>X</b>		<b>X</b>		
	GPIIb-IIIa (%)	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
	GPIIb-IIIa (MFI)						
	TMA (%)		<b>X</b>				
	TNA (%)	<b>X</b>	<b>X</b>				

Skraćenice: EK, koprive; EM, ekstrakt mirođije; EŠČ, ekstrakt šarplaninskog čaja; Eklj, ekstrakt kelja; EN, ekstrakt nara; EJJ, ekstrakt japanske jabuke, statistički značajno manje u odnosu na kontrolu (**X**); statistički značajno veće u odnosu na kontrolu (**X**)

Prikazani rezultati ukazuju da je na trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom došlo do značajnog smanjenja procenta P-selektin pozitivnih trombocita delovanjem 4 od 6 ispitivanih ekstrakata: ekstrakta koprive, mirođije, šarplaninskog čaja i kelja. Kod zdravih ispitanika smanjenje procenta P-selektin pozitivnih trombocita uočeno je samo nakon delovanja ekstrakta mirođije i kelja. Smanjenje procenta GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita kod ispitanika sa metaboličkim sindromom uočeno je nakon delovanja svih ispitivanih ekstrakata, dok je taj efekat kod zdravih subjekata pokazan samo nakon delovanja ekstrakta šarplaninskog čaja. Neočekivano, u ovoj populaciji ekstrakti mirođije i japanske jabuke doveli su do povećanja procenta GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita.

Na trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom pokazan uticaj ekstrakata koprive, mirođije i kelja na procenat P-selektin pozitivnih trombocita bio je praćen i smanjenjem gustine ovih receptora, što nije bio slučaj sa ekstraktom

šarplaninskog čaja. Kod zdravih ispitanika ekstrakti mirođije i kelja, koji su doveli do značajnog smanjenja P-selektin pozitivnih trombocita, doveli su i do smanjenja gustine ovih adhezionih receptora. Nijedan od ispitivanih ekstrakata nije uticao na gustinu GPIIb-IIIa na trombocitima zdravih, kao i ispitanika sa metaboličkim sindromom.

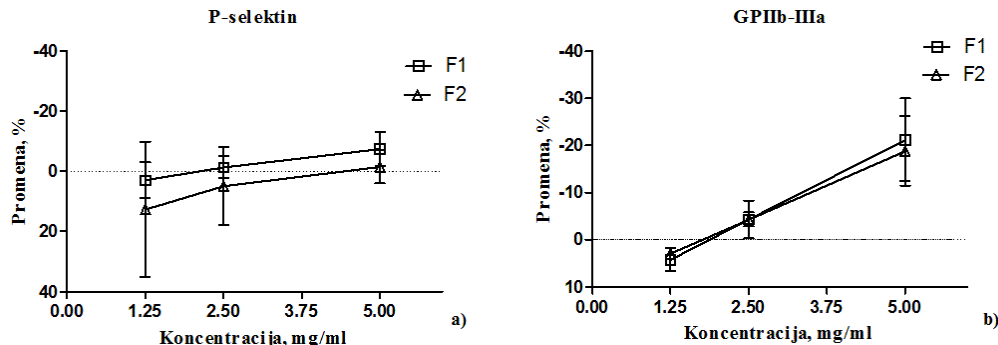
Analizom uticaja ispitivanih ekstrakata na parametre heterotipske agregacije sa leukocitima, pokazano je da delovanje ispitivanih ekstrakata nije dovelo do smanjenja agregata trombocita i monocita ispitanika sa metaboličkim sindromom. Ekstrakt koprive doveo je do smanjenja agregata sa neutrofilima, dok je nakon delovanja ekstrakta mirođije u ovoj grupi ispitanika došlo do povećanja agregacije trombocita i sa monocitima i sa neutrofilima. Na agregate trombocita i monocita zdravih ispitanika uticali su ekstrakti koprive, šarplaninskog čaja i japanske jabuke, i u slučaju ekstrakta šarplaninskog čaja taj efekat je praćen i smanjenjem agregacije trombocita sa neutrofilima. Značajno je uočiti da ovi ekstrakti nisu uticali na markere aktivacije, i moguće je da je pokazno delovanje posredovano delovanjem usmerenim na leukocite.

### Uticaj ekstrakta aronije na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa

Uticaj ekstrakta aronije na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, ispitivan je u uzorcima krvi 4 ispitanika sa metaboličkim sindromom, nakon delovanja ADP-a ( $0,5 \mu\text{M}$ ) kao agonista aktivacije trombocita. Ispitivano je delovanje dve frakcije etanolno-vodenog (60% v/v) ekstrakta ploda aronije, metanolne frakcije (F1) i vodene frakcije (F2), u koncentracijama 1,25; 2,5 i 5 mg/mL, izražene na masu početnog etanolno-vodenog ekstrakta.

Analiza dve odvojene frakcije ekstrakta aronije imala je za cilj procenu specifičnog delovanja antocijana, s obzirom da je u okviru preliminarnih ispitivanja ustanovljeno da se ove frakcije nisu razlikovale po sadržaju ukupnih fenola, ali je sadržaj ukupnih monomernih antocijana u metanolnoj frakciji bio znatno viši u odnosu na vodenu frakciju i iznosio  $0,206 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$  u F1, u odnosu na  $0,021 \pm 0,004 \text{ mg/mL}$  ekvivalenta cijanidin-3-glukozida u F2.

Dobijeni rezultati, izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolni uzorak, tretiran DMSO-om kao kontrolom pre delovanja ADP-a, prikazani su na Slici 13.



**Slika 13.** Uticaj različitih koncentracija metanolne frakcije (F1) i vodene frakcije (F2) etanolno-vodenog ekstrakta ploda aronije na procenat P-selektin i GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u populaciji trombocita ( $n=20000$ ) nakon delovanja ADP ( $0,5 \mu\text{M}$ ) kao agonista. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu i predstavljeni kao srednja vrednost  $\pm$  S.D.

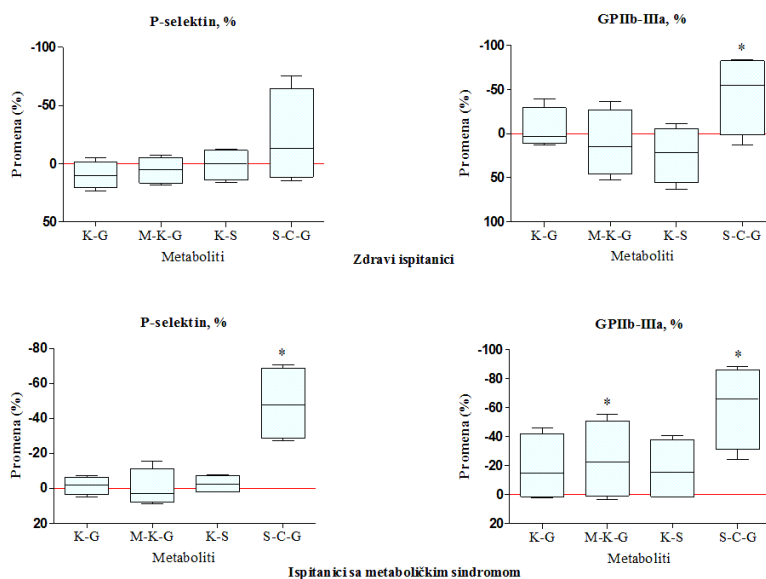
Pokazano je da nijedna od frakcija nije uticala na procenat P-selektin pozitivnih trombocita. Istovremeno, iako je uočen određeni trend dozno-zavisnog delovanja obe frakcije na procenat GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita, statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu nije pokazana ni u jednoj od ispitivanih koncentracija.

#### 4.2.2. Uticaj kvercetin-3-glukuronida, 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida, kvercetin-3'-sulfata, sulforafan-cistein-glicina i protokatehnične kiseline na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima

Ispitivan je uticaj kvercetin-3-glukuronida, 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida i kvercetin-3'-sulfata - humanih metabolita kvercetina.; sulforafan-cistein-glicina - metabolita izotiocijanata sulforafana i protokatehnične kiseline - metabolita cijanidin-glukozida.

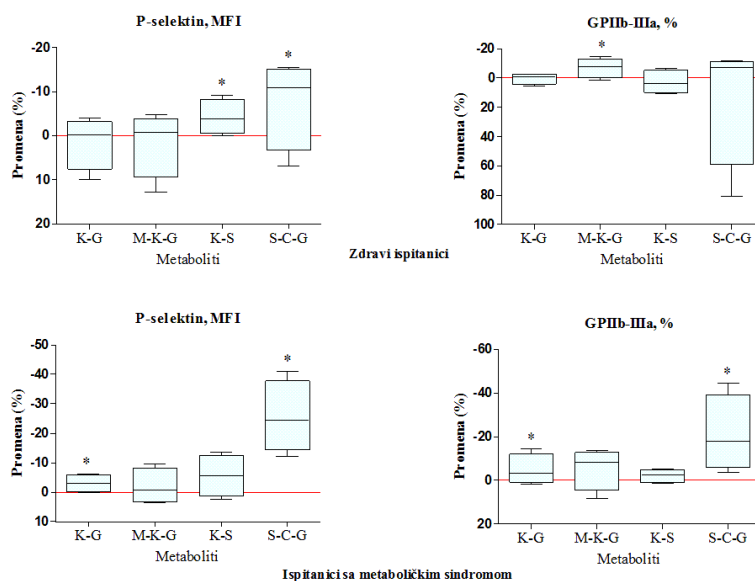
##### Uticaj metabolita kvercetina na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa

Uticaj delovanja ovih metabolita na parametre ekspresije P-selektina i GPIIb-IIIa: procenat P-selektin-pozitivnih i GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita i srednju vrednost gustine P-selektina i GPIIb-IIIa zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom, kao odgovor na agonističko delovanje arahidonske kiseline, prikazani su na Slikama 14 i 15, kao procenat promene analiziranih parametara u odnosu na kontrolne uzorke tretirane DMSO-om.



**Slika 14.** Uticaj metabolita kercetin-3-glukuronida (K-G), 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida (M-K-G), kvercetin-3-sulfata (K-S) i sulforafan-cistein-glicina (S-C-G) na procenat P-selektin i GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u populaciji trombocita krvi ispitanika sa metaboličkim sindromom i zdravih ispitanika, nakon delovanja arahidonske kiseline kao agonista. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om i predstavljeni „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: \*p<0.05; (Vilkoksonov test označenih rangova).



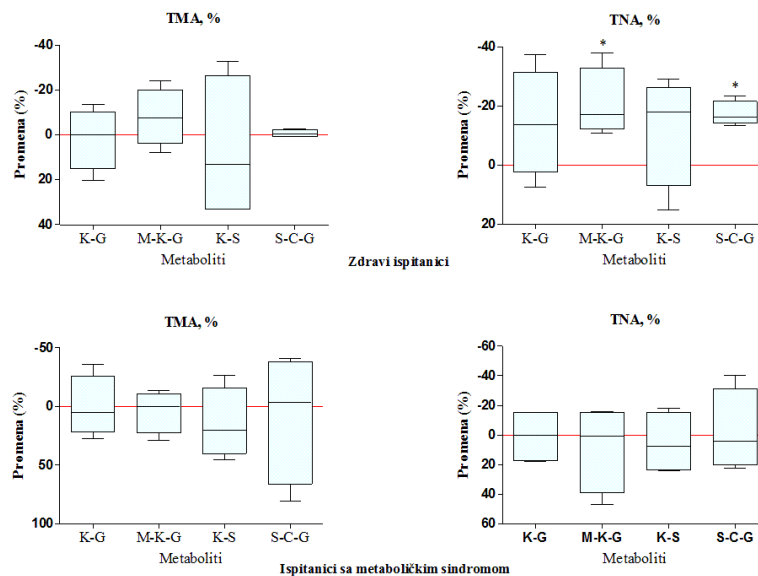


**Slika 15.** Uticaj metabolita kvercetin-3-glukuronida (K-G), 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida (M-K-G), kvercetin-3-sulfata (K-S) i sulforafan-cistein-glicina (S-C-G) na prosečnu gustinu P-selektin i GPIIb-IIIa na pojedinačnom trombocita u populaciji trombocita krvi ispitanika sa metaboličkim sindromom i zdravih ispitanika, nakon delovanja arahidonske kiseline kao agonista. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om i predstavljeni „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: \* $p < 0.05$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

U nezavisnom eksperimentu ispitivano je delovanje protokatehuične kiseline, u rasponu koncentracija od 10-1000  $\mu\text{M}$ , na procenat P-selektin-pozitivnih i GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita ispitanika sa metaboličkim sindromom.

Ni u jednoj od ispitivanih koncentracija nije uočena statistički značajna razlika delovanja protokatehuične kiseline u odnosu na delovanje DMSO-a, kao kontrole.

*Uticaoj metabolita kvercetin-3-glukuronida na agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima*



**Slika 16.** Uticaj metabolita kvercetin-3-glukuronida (K-G), 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida (M-K-G), kvercetin-3-sulfata (K-S) i sulforafan-cistein-glicina (S-C-G) na procenat agregata trombocita i monocita (TMA) u populaciji monocita i procenat agregata trombocita i neutrofila (TNA) u populaciji neutrofila krvi ispitanika sa metaboličkim sindromom i zdravih ispitanika, nakon delovanja arahidonske kiseline kao agonista. Rezultati su izraženi kao procenat promene u odnosu na kontrolu tretiranu DMSO-om i predstavljeni „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: \* $p < 0.05$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Primenom neparametarskog Vilkoksonovog testa ispitivana je statistički značajna razlika između vrednosti analiziranih parametara trombocita tretiranih metabolitima i vrednosti navedenih parametara trombocita tretiranih DMSO-om kao kontrolom, pre delovanja arahidonske kiseline. Pokazano je da ispitivani metaboliti dovode do statistički značajne promene pojedinih parametara aktivacije i agregacije trombocita indukovane delovanjem arahidonske kiseline, kod zdravih ispitanika i/ili ispitanika sa metaboličkim sindromom.

Prikaz parametara aktivacije i agregacije trombocita zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom, kod kojih je došlo do statistički značajne promene usled delovanja ispitivanih metabolita, dat je u Tabeli 21.

**Tabela 21.** Uticaj metabolita na parametre aktivacije i agregacije trombocita zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom

	Parametri	K-G	M-K-G	K-S	S-C-G
Zdravi ispitanici	P-sel (%)				
	P-sel (MFI)			X	X
	GPIIb-IIIa (%)				X
	GPIIb-IIIa (MFI)		X		
	TMA (%)				
	TNA (%)		X		X
Ispitanici sa metaboličkim sindromom	P-sel (%)				X
	P-sel (MFI)	X			X
	GPIIb-IIIa (%)		X		X
	GPIIb-IIIa (MFI)				X
	TMA (%)	X			
	TNA (%)				

Skraćenice: K-G, kvercetin-3-glukuronid; M-K-G, 3'-metil-kvercetin-3-glukuronid; K-S, kvercetin-3'-sulfat; S-C-G, sulforafan-cistein-glicina. (X); statistički značajno veće u odnosu na kontrolu

Prikazani rezultati ukazuju da je na trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom došlo do značajnog smanjenja procenta P-selektin pozitivnih trombocita samo delovanjem metabolita sulforafana, dok kod zdravih ispitanika smanjenje procenta P-selektin pozitivnih trombocita nije uočeno nakon delovanja bilo kog od ispitivanih metabolita. Smanjenje procenta GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita kod ispitanika sa metaboličkim sindromom uočeno je nakon delovanja svih ispitivanih ekstrakata, dok je taj efekat kod zdravih subjekata pokazan samo nakon delovanja sulforafan-cistein-glicina i 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida, a samo sulforafan-cistein-glicin utiče na ovaj parametar kod zdravih ispitanika.

Na trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom pokazan uticaj sulforafan-cistein-glicin na procenat trombocita koji eksprimiraju aktivacione markere praćen je i smanjenjem njihove gustine, dok na gustinu P-selektina utiče i kvercetin-3-glukuronid. Kod zdravih ispitanika do smanjenja gustine P-selektina dolazi usled delovanja sulforafan-cistein-glicina i kvercetin-3'-sulfata, dok je na gustinu GPIIb-IIIa značajno uticao 3'-metil-kvercetin-3-glukuronid.

Analizom uticaja ispitivanih metabolita na parametre heterotipske agregacije sa leukocitima, pokazano je da je delovanje kvercetin-3-glukuronida na smanjenje gustine P-selektina praćeno smanjenjem agregata trombocita sa monocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom, dok su kod zdravih ispitanika uticaj na agregaciju trombocita sa monocitima pokazali 3'-metil-kvercetin-3-glukuronid i sulforafan-cistein-glicin.

### 4.3. UTICAJ JEDNOKRATNE KONZUMACIJE NAMIRNICA KOJE SADRŽE POLIFENOLE NA AKTIVACIJU TROMBOCITA I NJIHOVU AGREGACIJU SA MONOCITIMA I NEUTROFILIMA

#### 4.3.1. Uticaj jednokratne konzumacije soka od aronije na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima

Uticaj jednokratne konzumacije soka od aronije na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima ispitivan je kod zdravih dobrovoljaca. Studija je dizajnirana kao nekontrolisana pilot studija, a ispitivani parametri određivani su pre i 2h nakon konzumacije soka, u bazalnim uslovima i nakon *in vitro* delovanja adenzin-difosfata (ADP) i arahidonske kiseline (AK) kao agonista aktivacije trombocita. Agonističko delovanje arahidonske kiseline ispitivano je u netretiranim uzorcima i uzorcima prethodno tretiranim acetil-salicilnom kiselinom (ASK) u *in vitro* eksperimentalnim uslovima. Dobijeni rezultati analizirani su primenom neparametarskog testa, Vilkoksonovog testa označenih rangova. Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je  $p \leq 0,05$ .

Osnovne karakteristike grupe ispitanika, uključujući vrednosti antropometrijskih i biohemijskih parametara ispitanika, prikazane su u Tabeli 22.

**Tabela 22.** Osnovne karakteristike grupe ispitanika uključenih u studiju

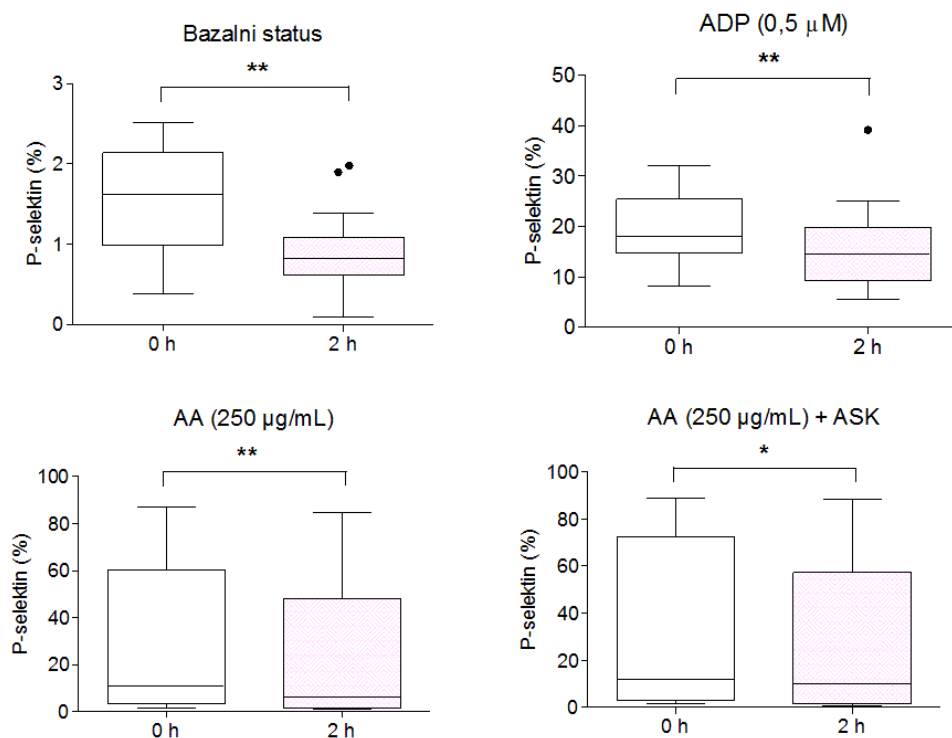
Karakteristike ispitanika	Vrednosti
Broj ispitanika	20
Starost*	25,75 ± 2,56
Pol (M/Ž)	12/8
Obim struka (M)*	92,00 ± 24,29
Obim struka (Ž)*	75,25 ± 23,16
Indeks telesne mase*	24,34 ± 4,15
Sistolni krvni pritisak (mmHg)*	122,40 ± 25,32
Dijastolni krvni pritisak (mmHg)*	78,30 ± 20,03
Nivo HDL holesterola (mmol/L)*	1,34 ± 0,10
Nivo triglicerida (mmol/L)*	0,98 ± 0,59
Nivo glukoze (mmol/L)*	4,53 ± 0,70

\* Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D. (n=20)

*Uticaj konzumacije soka od aronije na ekspresiju P-selektina*

Uticaj konzumacije soka od aronije na aktivaciju trombocita praćen je uticajem na ekspresiju P-selektina kao aktivacionog markera, određivanjem procenta P-selektin-pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita (n=20000), srednje vrednosti gustine P-selektina na pojedinačnim trombocitima i indeksa aktivacije trombocita.

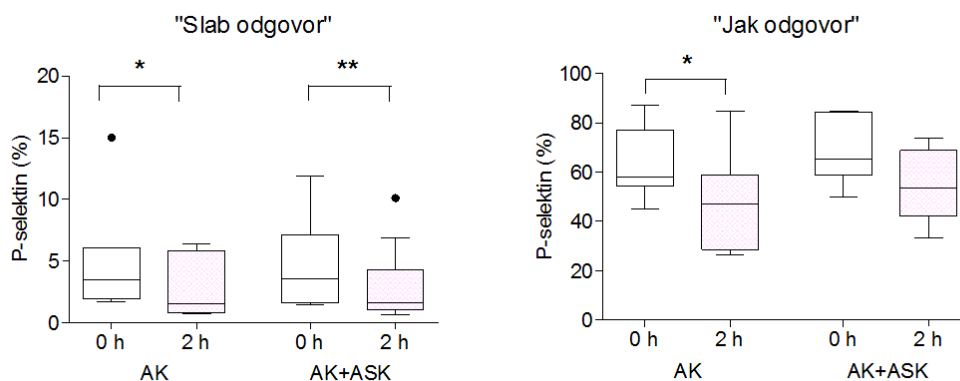
Primenom neparametarske analize dobijenih podataka pokazano je da je nakon konzumacije došlo do statistički značajnog smanjenja bazalnih vrednosti procenata P-selektin-pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita ( $p < 0,01$ ) kao i vrednosti ispitivanog parametra nakon *ex vivo* delovanja sub-optimalne koncentracije ADP-a ( $p < 0,01$ ). Značajan uticaj konzumacije na procenat P-selektin-pozitivnih trombocita pokazan je i nakon *ex vivo* delovanja AK ( $p < 0,01$ ), i delovanja AK na uzorke krvi tretirane ASK ( $p < 0,05$ ). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 17, predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima (na način opisan u poglavlju 3.2.12).



**Slika 17.** Procenat P-selektin pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita zdravih ispitanika, pre i 2h nakon konzumacije soka od aronije. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Uočena je značajna inter-individualna razlika u odgovoru na delovanje AK u koncentraciji od 250 µg/mL, kako pre tako i posle konzumacije, sa rasponom između minimalnih i maksimalnih vrednosti od 1,69 - 86,88 % pre konzumacije i 0,79 - 84,57 % posle konzumacije. Ispitivanjem dozne zavisnosti agonističkog delovanja AK na trombocite, u pogledu uticaja na procenat P-selektin-pozitivnih trombocita u toku preliminarnih ispitivanja na uzorcima krvi 3 zdrava ispitanika, pokazano je da on nije linearan, kako je to slučaj sa odgovorom na ADP. S ciljem detaljnije analize dobijenih podataka u okviru interventne studije, grupa ispitanika je podeljena na dve podgrupe definisane kao podgrupa sa „slabim odgovorom“ na AK, odnosno procentom P-selektin pozitivnih trombocita nakon delovanja AK pre konzumacije manjim od 15% (n = 12) i podgrupa sa „jakim odgovorom“, odnosno procentom P-selektin pozitivnih trombocita pre konzumacije većim od 15% (n = 8).

Dobijeni rezultati uticaja konzumacije na procenat P-selektin-pozitivnih trombocita kao odgovor na delovanje AK, bez i sa preinkubacijom uzoraka krvi sa ASK, u definisanim podgrupama prikazani su na Slici 18.

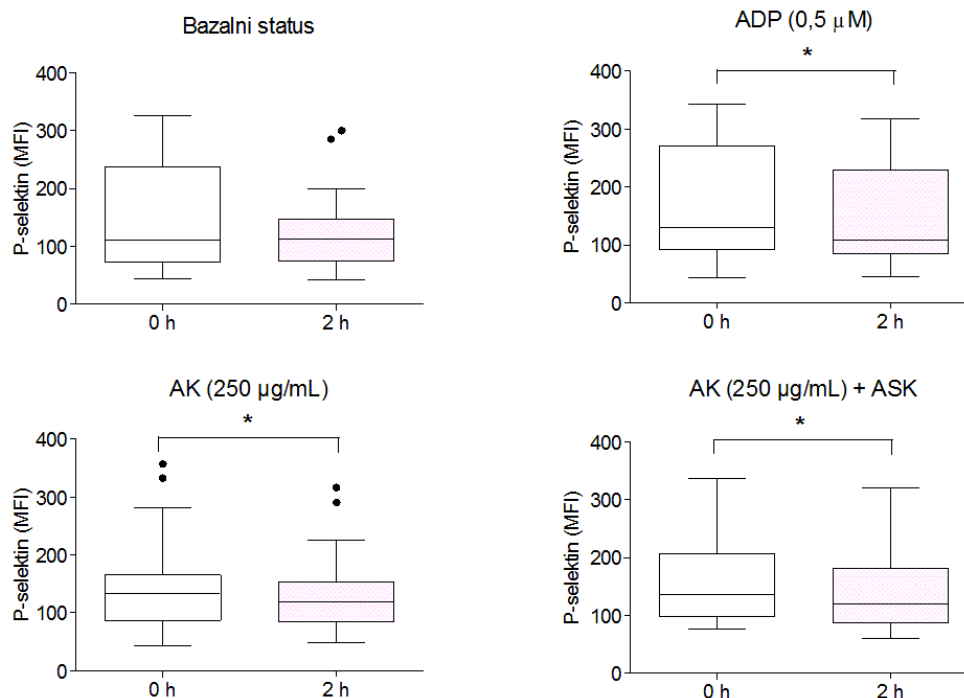


**Slika 18.** Procenat P-selektin pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita nakon delovanja AK i ASK + AK, pre i 2h nakon konzumacije soka od aronije. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Nezavisnom analizom rezultata dve grupe ispitanika definisanih na osnovu odgovora na delovanje AK, pokazano je da i kod ispitanika sa „slabim odgovorom“ i kod ispitanika sa „jakim odgovorom“ na delovanje AK, nakon konzumacije soka od aronije dolazi do statistički značajnog smanjenja procenta P-selektin-pozitivnih trombocita ( $p < 0,05$ , u obe grupe ispitanika). Istovremeno značajan uticaj konzumacije

na AK-om indukovano povećanje ispitivanog parametra u uzorcima pretretiranim ASK, uočeno je samo kod ispitanika sa „slabim odgovorom“ na delovanje AK ( $p < 0,01$ ).

Uticao konzumacije soka od aronije na srednje vrednosti gustine P-selektina na pojedinačnim trombocitima, izražena kao srednja vrednost intenziteta fluorescencije (MFI), u bazalnim uslovima i nakon delovanja ADP i AK kao agonista prikazan je na Slici 19.

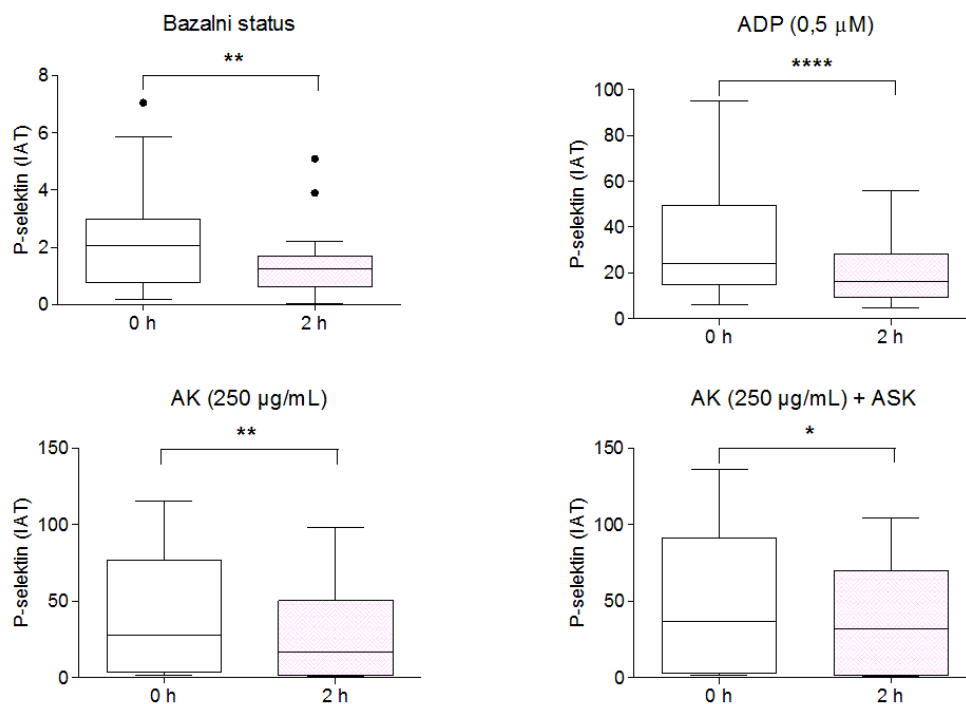


**Slika 19.** Srednja vrednost gustine P-selektina (MFI) na trombocitima pre i 2h nakon konzumacije soka od aronije. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Neparametarskom analizom dobijenih srednjih vrednosti gustine P-selektina na trombocitima pokazano je da se gustina ovog aktivacionog markera izražena u ukupnoj populaciji trombocita u bazalnim uslovima ne menja nakon konzumacije u odnosu na vrednosti pre konzumacije. Istovremeno, uočeno je da konzumacija soka od aronije statistički značajno utiče na gustinu P-selektina nakon agonističkog delovanja suboptimalne koncentracije ADP, nakon delovanja AK kao agonista, kao i nakon delovanja AK na trombocite tretirane ASK u *ex vivo* uslovima. Nivo statističke značajnosti u sva tri slučaja je  $p < 0,05$ .

Na osnovu literaturnih podataka, jedan od načina predstavljanja ekspresije aktivacionih markera trombocita je indeks aktivacije trombocita (IAT), koji objedinjuje procenat trombocita na kojima je ovaj receptor eksprimiran i gustinu receptora na trombocitima i predstavlja relativnu meru svih raspoloživih receptora.

Prikaz vrednosti indeksa aktivacije trombocita (IAT) dobijene računskim putem iz prethodno određenih parametara, pre i posle konzumacije soka od aronije, u bazalnom statusu i nakon delovanja agonista dat je na Slici 20.

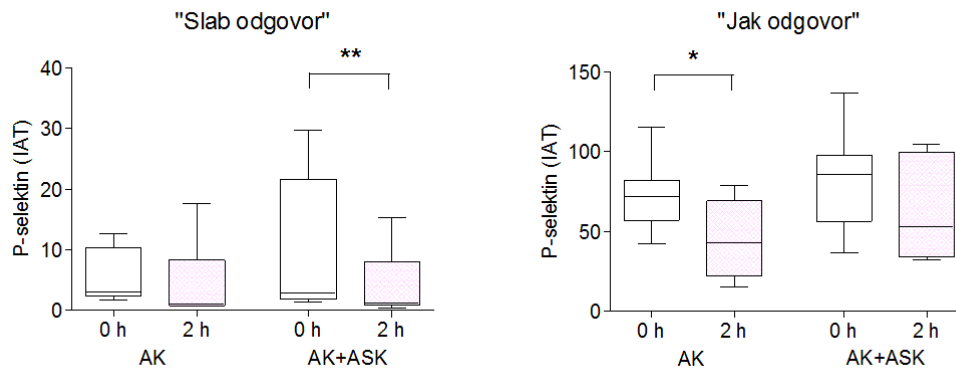


**Slika 20.** Indeks aktivacije trombocita (IAT) u odnosu na P-selektin pre i 2h nakon konzumacije soka od aronije. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0005$  (Vilkoksonov test označenih rangova).

Statistička analiza prikazanih IAT vrednosti pokazala je da se značajno smanjenje procenta P-selektin-pozitivnih trombocita u bazalnom stanju nakon konzumacije ispitivanog soka reflektovalo i na promenu IAT vrednosti, iako nije došlo do promene gustine P-selektina. Efekat konzumacije na IAT vrednosti je izraženiji u odnosu na efekte na procenat P-selektin-pozitivnih trombocita, u uslovima *ex vivo* delovanja ADP kao agonista ( $p < 0,0005$ ), dok se nivo značajnosti promene IAT vrednosti nakon konzumacije pri delovanju AK i delovanju AK na trombocite tretirane ASK, nije promenio u odnosu na nivoe dobijene analizom procenata P-selektin-



pozitivnih trombocita. Analogno analizi procenta P-selektin-pozitivnih trombocita, izvršena je nezavisna neparametarska analiza IAT vrednosti u podgrupama ispitanika sa „slabim“ i „jakim odgovorom“ na AK i dobijeni rezultati prikazani su na Slici 21.



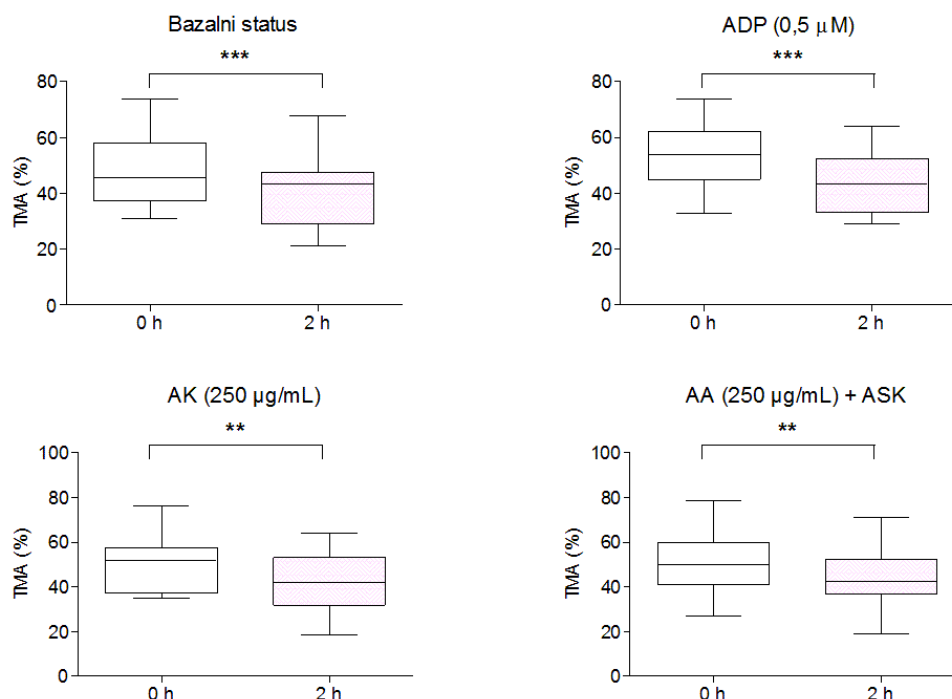
**Slika 21.** Indeks aktivacije trombocita (IAT) u odnosu na P-selektin nakon delovanja AK i ASK + AK, pre i 2h nakon konzumacije soka od aronije. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da je značajno smanjenje odgovora na delovanje AK uočeno nakon konzumacije soka od aronije, izraženo kao IAT, izraženije i statistički značajno kod ispitanika sa „jakim odgovorom“ na AK, dok je povoljno delovanje konzumacije na IAT nakon delovanja AK na ASK pretretirane uzorke krvi, statistički značajno jedino kod ispitanika sa „slabim odgovorom“ ( $p \leq 0,01$ ).

Značajno je istaći da je analizom podataka dobijenih u uzorcima krvi pre intervencije utvrđeno da pre-tretman acetil-salicilnom kiselinom ( $56 \mu\text{M}$ ) u *in vitro* uslovima koji je prethodio delovanju AK nije značajno uticao na bilo koji od analiziranih parametara ekspresije P-selektina kao odgovor na delovanje AK, u ukupnoj populaciji ispitanika, kao i u definisanim podgrupama. U grupi ispitanika sa „slabim odgovorom“ pretretman ASK pre delovanja AK, nakon konzumacije doveo je do značajnog smanjenja procenta P-selektin pozitivnih trombocita u odnosu na odgovor na AK pre konzumacije ( $p = 0,022$ ), dok je analogno smanjenje IAT vrednosti bilo na granici statističke značajnosti ( $p = 0,066$ ).

*Uticaj konzumacije soka od aronije na agregaciju trombocita sa monocitima*

Kao parametar agregacije trombocita sa monocitima određivan je procenat agregata trombocita i monocita (TMA) u ukupnoj populaciji monocita (n=1000). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 22.



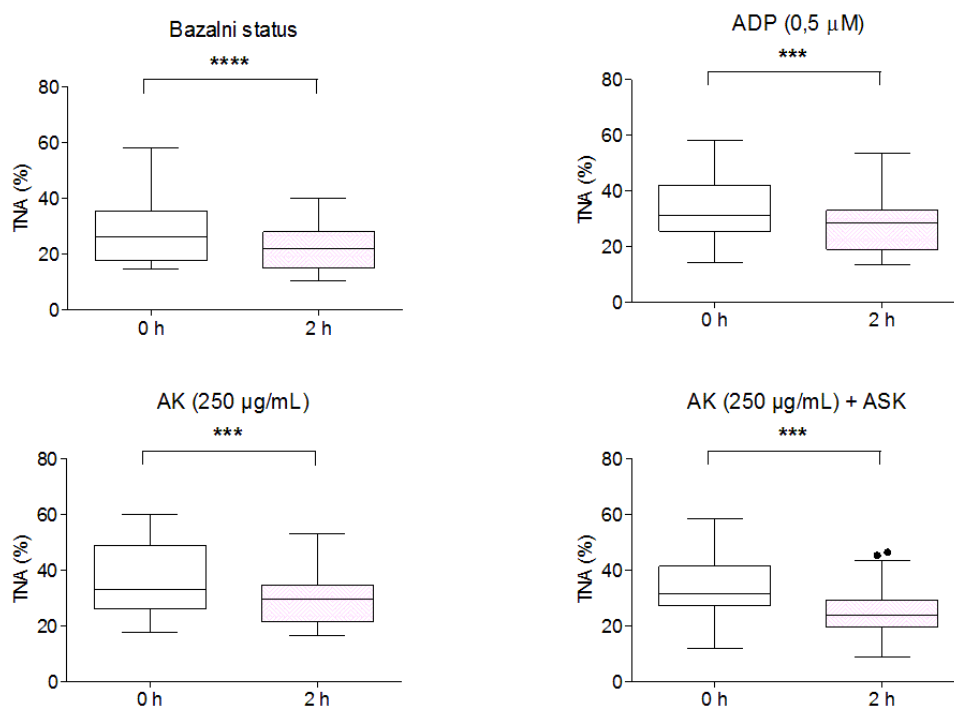
**Slika 22.** Procenat agregata trombocita i monocita (TMA) u ukupnoj populaciji monocita, pre i 2h nakon konzumacije soka od aronije. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (Vilkoksonov test označenih rangova).

Analizom dobijenih podataka neparametarskim testom za utvrđivanje razlike između dva ponovljena merenja pokazano je da je konzumacija soka od aronije dovela do statistički značajnog smanjenja agregata trombocita i monocita u bazalnim uslovima i nakon delovanja agonista. Statistički značajniji je bio efekat konzumacije na agregaciju u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja ADP ( $p \leq 0,01$ ), dok je nivo značajnosti uticaja konzumacije na AK-indukovanu agregaciju, kao i na agregaciju indukovanu AK u uzorcima pretretiranim ASK u oba slučaja iznosio  $p \leq 0,001$ . Uticaj konzumacije na agregaciju trombocita sledio je efekte na ekspresiju P-selektina, izražen kao procenat P-selektin pozitivnih trombocita, kao i odnos značajnosti različitih

eksperimentalnih uslova, ali je istovremeno bio izraženiji u odnosu na efekte na ispitivani marker aktivacije.

*Uticaj konzumacije soka od aronije na agregaciju trombocita sa neutrofilima*

Kao parametar agregacije trombocita sa neutrofilima određivan je procenat agregata trombocita i neutrofila (TNA) u ukupnoj populaciji neutrofila (min=10000). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 23.



**Slika 23.** Procenat agregata trombocita i neutrofila (TNA) u ukupnoj populaciji neutrofila, pre i 2h nakon konzumacije soka od aronije. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0005$  (Vilkoksonov test označenih rangova).

Neparametarskom analizom rezultata ponovljenih merenja pokazano je da konzumacija soka od aronije dovodi do statistički značajnog smanjenja agregata trombocita i neutrofila u bazalnim uslovima i nakon delovanja agonista. Statistički najznačajniji efekat konzumacije na agregaciju trombocita neutrofilima pokazan je u bazalnom statusu ( $p \leq 0,0005$ ).

**4.3.2. Uticaj jednokratne konzumacije čaja od koprive, čaja od mirođije i šarplaninskog čaja na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima**

Uticaj jednokratne konzumacije čaja od koprive, čaja od mirođije i šarplaninskog čaja na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima ispitanika je u okviru randomizirane, kontrolisane studije paralelnog dizajna, kod ispitanika sa metaboličkim sindromom.

Osnovne karakteristike grupe ispitanika, uključujući vrednosti antropometrijskih i biohemijskih parametara u serumu ukupne populacije ispitanika, kao i ispitanika u pojedinim interventnim grupama, prikazane su u Tabeli 23 i 24.

**Tabela 23.** Demografske karakteristike, antropometrijski parametri i vrednosti krvnog pritiska u ukupnoj populaciji ispitanika i ispitanika u pojedinim interventnim grupama

Karakteristike	Ukupno	Čaj od koprive	Čaj od mirođije	Šarplani -nski čaj	Topla voda	p - vred.
Broj ispitanika	80	20	20	20	20	-
Pol (M / Ž)	40 / 40	10 / 10	8 / 12	11 / 9	11 / 9	-
Starost	53,7 ± 6,23	55,4 ± 5,11	53,81 ± 6,71	52,89 ± 6,43	52,47 ± 6,77	0,427
Obim struka (cm)	99,05 ± 11,28	100,93 ± 10,44	98,55 ± 13,16	97,95 ± 13,22	98,23 ± 9,65	0,827
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	28,29 ± 3,96	29,47 ± 3,65	28,85 ± 2,63	28,39 ± 4,49	28,59 ± 3,76	0,785
Sistolni krvni pritisak (mmHg)	130,38 ± 14,98	127,92 ± 20,59	130,00 ± 16,73	128,17 ± 10,12	134,86 ± 10,98	0,405
Dijastolni krvni pritisak (mmHg)	82,27 ± 10,01	83,46 ± 7,40	84,18 ± 13,35	81,15 ± 7,32	86,29 ± 10,16	0,391

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D.; statistička značajnost između grupa analizirana ANOVA testom

**Tabela 24.** Vrednosti biokemijskih parametara u serumu u ukupnoj populaciji ispitanika i ispitanika u pojedinim interventnim grupama

Parametri	Ukupno	Čaj od koprive	Čaj od mirođije	Šarplani -nski čaj	Topla voda	p
Glukoza (mmol/l)	6,17 ± 2,10	5,88 ± 1,39	6,39 ± 3,35	5,80 ± 1,55	6,64 ± 1,74	0,512
Ukupni holesterol (mmol/l)	5,85 ± 1,38	5,93 ± 1,44	5,91 ± 1,43	5,51 ± 1,34	6,07 ± 1,38	0,584
LDL holesterol (mmol/l)	3,86 ± 1,25	3,95 ± 1,25	3,98 ± 1,48	3,63 ± 1,13	4,04 ± 1,27	0,768
HDL holesterol (mmol/l)	1,27 ± 0,26	1,31 ± 0,14	1,24 ± 0,27	1,29 ± 0,27	1,26 ± 0,34	0,881
Trigliceridi (mmol/l)	2,21 ± 1,69	2,32 ± 2,19	1,84 ± 1,01	2,18 ± 1,42	2,45 ± 1,94	0,763

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D.; statistička značajnost između grupa analizirana ANOVA testom

S obzirom da je osnovni kriterijum za uključivanje u studiju bilo ispunjavanje kriterijuma metaboličkog sindroma, koji predstavlja skup najmanje 3 od definisanih 5 faktora rizika za nastanak KVB, postojala je inter-individualna razlika u pogledu zastupljenosti pojedinih faktora rizika. Analizom dobijenih vrednosti za parametre definisane kriterijumima metaboličkog sindroma ANOVA testom nisu uočene statistički značajne razlike između grupa.

Dodatno su određivani broj trombocita u jedinici zapremine krvi i srednje vrednosti zapremine trombocita i dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 25. Broj trombocita predstavlja važan faktor u analizi njihove funkcije protočnom citometrijom, kako bi se standardizovali uslovi prilikom obeležavanja trombocita odgovarajućim antitelima. Vrednosti kod svih ispitanika bile su u granicama referentnih vrednosti i nije bilo statistički značajne razlike između grupa.

Vrednost srednje zapremine trombocita određivana je u toku preliminarnih ispitivanja pod pretpostavkom da povišene vrednosti ukazuju na povećan broj hiper-aktivnih retikuliranih trombocita. I vrednosti ovog parametra bile su u granicama referentnih vrednosti i nije bilo značajne razlike u vrednostima ovih parametara između grupa.

**Tabela 25.** Broj trombocita i srednja vrednost zapremine trombocita ukupnoj populaciji ispitanika i ispitanika u pojedinim interventnim grupama

Karakteristike	Ukupno	Čaj od koprive	Čaj od mirođije	Šarplani -nski čaj	Topla voda	p - vred.
Broj trombocita (x 10 <sup>9</sup> /L)	275,5 ± 229,3	277,2 ± 229,3	370,6 ± 408,5	242,58 ± 68,95	227,0 ± 63,12	0,296
MPV (fl)	8,12 ± 0,96	7,94 ± 0,83	8,01 ± 0,72	7,98 ± 0,91	8,44 ± 1,07	0,368

Rezultati su predstavljani kao srednja vrednost ± S.D.; statistička značajnost između grupa analizirana ANOVA testom

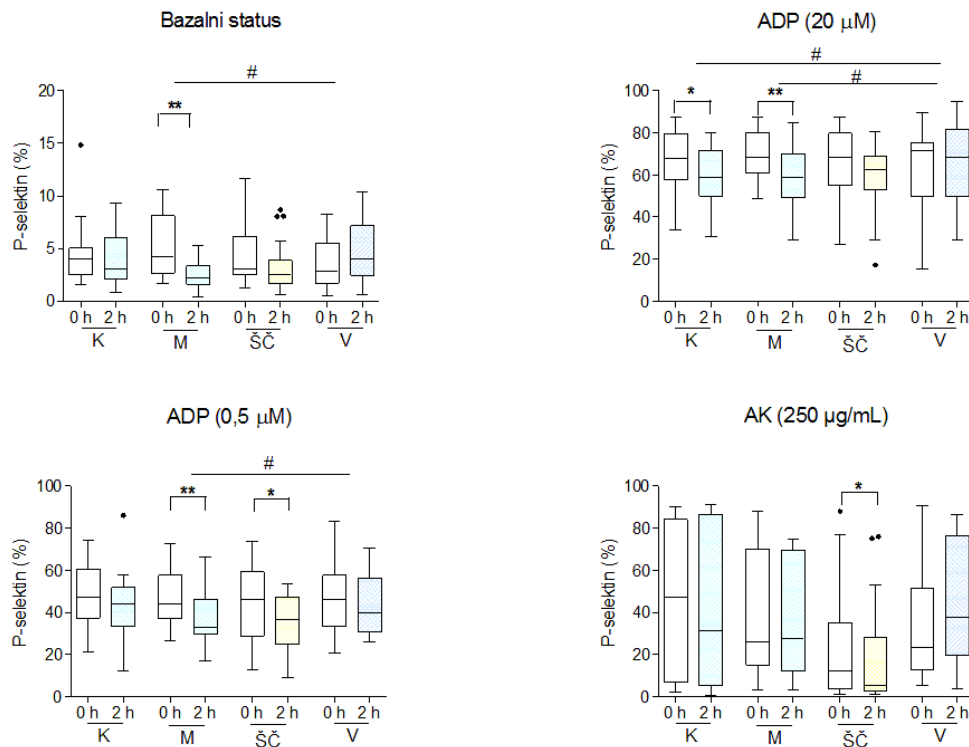
Ispitivani parametri funkcije trombocita određivani su pre i 2h nakon konzumacije, u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata (ADP) i delovanja arahidonske kiseline (AK) kao agonista aktivacije trombocita. Agonističko delovanje arahidonske kiseline ispitivano je u netretiranim uzorcima i uzorcima prethodno tretiranim acetil-salicilnom kiselinom u *in vitro* eksperimentalnim uslovima.

Primenom neparametarske analize rezultata ponovljenih merenja (Vilkoksonov test označenih rangova) ispitivan je uticaj svake od intervencija. Analiza apsolutnih promena u vrednostima analiziranih parametara nakon dijetarne ili kontrolne intervencije, za sve četiri grupe ispitanika, vršena je primenom Kruskal-Wallis-ovog testa. Ukoliko je uočena statistički značajna razlika između grupa, višestrukim poređenjem promena u tri interventne grupe sa promenama u kontrolnoj grupi Man Vitnijevim U testom, ispitivane su razlike u odnosu na kontrolnu intervenciju. Kriterijum za statistički značajnu promenu je u ovom slučaju podešen u odnosu na broj poređenja i iznosio je  $p < 0,0167$  (0,05/3).

#### *Uticaj konzumacije ispitivanih čajeva na ekspresiju P-selektina*

Kao parametri ekspesije P-selektina određivani su procenat P-selektin-pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita (n=20000) i srednja vrednost gustine P-selektina na pojedinačnim trombocitima. Dobijeni rezultati poređeni su sa rezultatima dobijenim u kontrolnoj grupi koja je konzumirala toplu vodu.

Procenti P-selektin-pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita pre i posle svake od intervencija prikazane su na Slici 24.



**Slika 24.** Procenat P-selektin pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita ispitanika sa metaboličkim sindromom, pre i 2h nakon konzumacije čaja od koprive (K), mirođije (M), šarplaninskog čaja (ŠČ) i tople vode (V). Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova); statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu: #  $p < 0,0167$ ; (Man-Vitnijev U test)

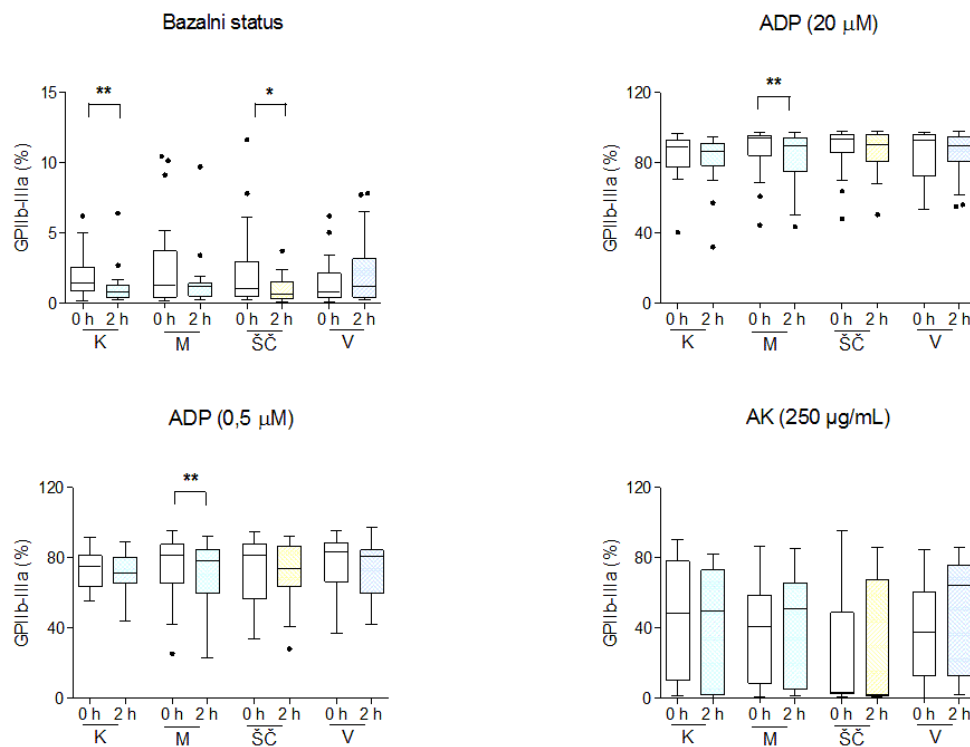
Neparametarska analiza rezultata Vilkoksonovim testom označenih rangova pokazala je najizraženiji uticaj konzumacije čaja od mirođije. Nakon konzumacije ovog čaja došlo je do statistički značajnog smanjenja procenta P-selektin-pozitivnih trombocita u odnosu na njihov procenat pre konzumacije, u nestimulisanim uzorcima, kao i u uzorcima stimulisanim *ex vivo* optimalnom (20 μM) i suboptimalnom (0,5 μM) koncentracijom ADP ( $p \leq 0,01$ , u sva tri slučaja). Uočeni efekti su bili statistički značajni i nakon poređenja sa uticajem kontrolne intervencije.

Konzumacija čaja od koprive značajno je smanjila agonističko delovanje optimalne koncentracije ADP-a u odnosu na delovanje pre konzumacije ( $p \leq 0,01$ ) i efekti su bili statistički značajni i nakon poređenja sa uticajem kontrolne intervencije. Istovremeno, nije pokazan značajan uticaj na delovanje niže koncentracije ovog agonista.

Konzumacija šarplaninskog čaja dovela je do statistički značajnog smanjenja procenta P-selektin pozitivnih trombocita kao odgovora na delovanje suboptimalne koncentracije ADP-a i AK, u poređenju sa vrednostima pre konzumacije ali sa manjim nivoom značajnosti ( $p \leq 0,05$ ). Promene u odnosu na vrednosti parametara pre konzumacije, nisu se značajno razlikovale od promena u kontrolnoj grupi.

Nijedna od intervencija nije statistički značajno uticala na procenat P-selektin pozitivnih trombocita određenih nakon delovanja AK na uzorke pre-tretirane ASK ( $56\mu\text{M}$ ) poređenih sa vrednostima u tretiranim uzorcima pre konzumacije.

Pored procenta P-selektin-pozitivnih trombocita, određivana je i gustina ovih receptora na površini trombocita i dobijeni rezultati prikazani su na slici 25.



**Slika 25.** Gustina P-selektina na pojedinačnim trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom, pre i 2h nakon konzumacije čaja od koprive (K), mirođije (M), šarplaninskog čaja (ŠČ) i tople vode (V). Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova)

Analizom gustine P-selektina na trombocitima (MFI) pre i posle konzumacije čajeva uočeno je da smanjenje procenta P-selektin pozitivnih trombocita nakon konzumacije čaja od mirođije, u netretiranim uzorcima i uzorcima krvi tretiranim ADP-om *ex vivo*, nije bilo praćeno smanjenjem gustine P-selektina. Do smanjenja gustine

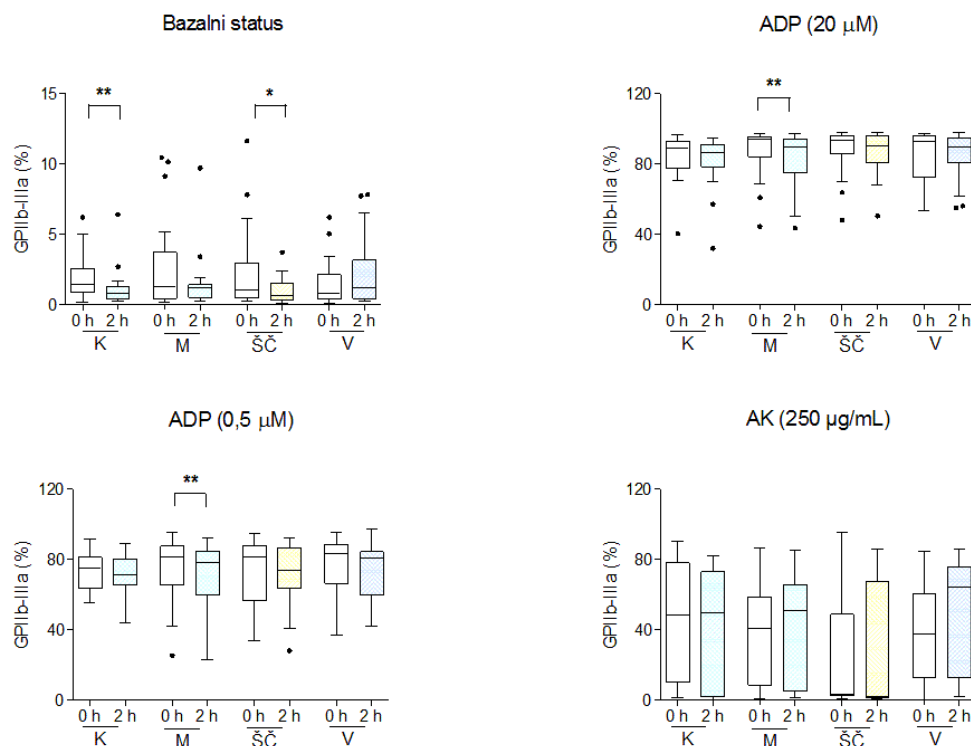


ovog aktivacionog markera na trombocitima došlo je jedino nakon konzumacije šarplaniskog čaja u uzorcima tretiranim suboptimalnim koncentracijama ADP-a ( $p \leq 0,05$ ), ali poređenjem dobijenih promena sa promenama u kontrolnoj grupi neparameterskim testom, nije uočena statistički značajna razlika.

U uzorcima pretretiranim ASK ( $56\mu\text{M}$ ) i nakon toga izloženim delovanju AA nisu uočeni značajni efekti konzumacije ispitivanih čajeva niti tople vode kao kontrolne intervencije na gustinu P-selektina.

#### Uticao konzumacije ispitivanih čajeva na ekspresiju GPIIb-IIIb

Kao parametri ekspresije GPIIb-IIIa određivani su procenat GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita ( $n=20000$ ), srednja vrednost gustine GPIIb-IIIa na pojedinačnim trombocitima. Vrednosti procenata GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita, pre i nakon konzumacije čajeva i tople vode, prikazane su na Slici 26.



**Slika 26.** Procenat GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita ispitanika sa metaboličkim sindromom, pre i 2h nakon konzumacije čaja od koprive (K), mirođije (M), šarplaniskog čaja (ŠČ) i tople vode (V). Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova)

Primenom Vilkoksonovog testa označenih rangova pokazan je značajan uticaj konzumacije čaja od koprive na ispitivani parametar u nestimulisanim uzorcima ( $p \leq 0,01$ ), kao i značajan uticaj konzumacije čaja od mirođije na procenat GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u uzorcima stimulisanim *ex vivo* optimalnom (20  $\mu\text{M}$ ) i suboptimalnom (0,5  $\mu\text{M}$ ) koncentracijom ADP ( $p \leq 0,01$ , u oba slučaja). Vrednosti ispitivanog parametra u nestimulisanim uzorcima bile su značajno niže nakon konzumacije šarplaninskog čaja, ali sa nižim nivoom značajnosti ( $p \leq 0,05$ ).

Analizom apsolutnih promena ispitivanog parametra u svakoj od četiri interventne grupe primenom Kruskal-Valisovog testa, nije uočena statistički značajna razlika između grupa, odnosno pokazane promene nakon intervencija nisu bile značajno različite u odnosu na promene u kontrolnoj grupi.

Nije pokazan značajan efekat konzumacije čajeva ili tople vode na procenat GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita nakon delovanja AK kao agonista niti nakon delovanja AK na uzorke pretretirane ASK.

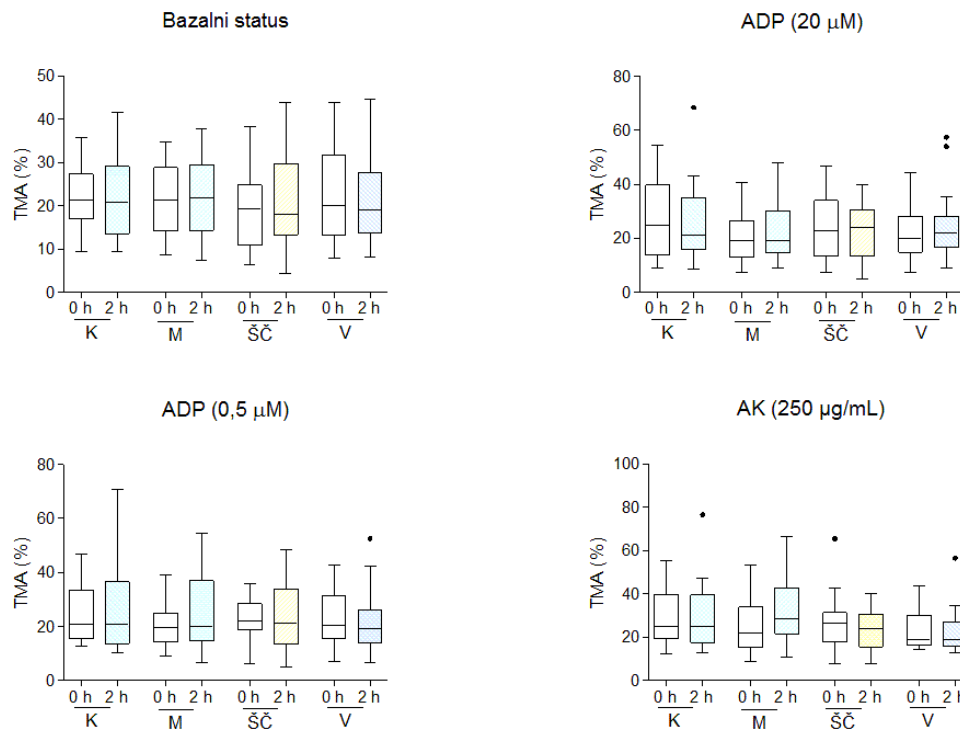
Analizom gustine GPIIb-IIIa na trombocitima nijedna od intervencija nije pokazala značajne efekte u poređenju sa kontrolnom intervencijom u netretiranim uzorcima i uzorcima tretiranim agonistima.

#### *Uticaj konzumacije ispitivanih čajeva na agregaciju trombocita sa monocitima*

Kao parametar agregacije trombocita sa monocitima određivan je procenat agregata trombocita i monocita (TMA) u ukupnoj populaciji monocita ( $n = 1000$ ). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 27.

Statističkom analizom rezultata dobijenih u nestimulisanim uzorcima i uzorcima stimulisanim odgovarajućim agonistima primenom Wilcoxon-ovog testa, pokazano je da konzumacija ispitivanih čajeva i tople vode kao kontrole, nije značajno uticala na agregaciju trombocita sa monocitima.

Nije bilo značajne razlike u procentu TMA u uzorcima tretiranim ASK pre delovanja AK kao agonista, nakon intervencije u odnosu na vrednosti pre konzumacije.

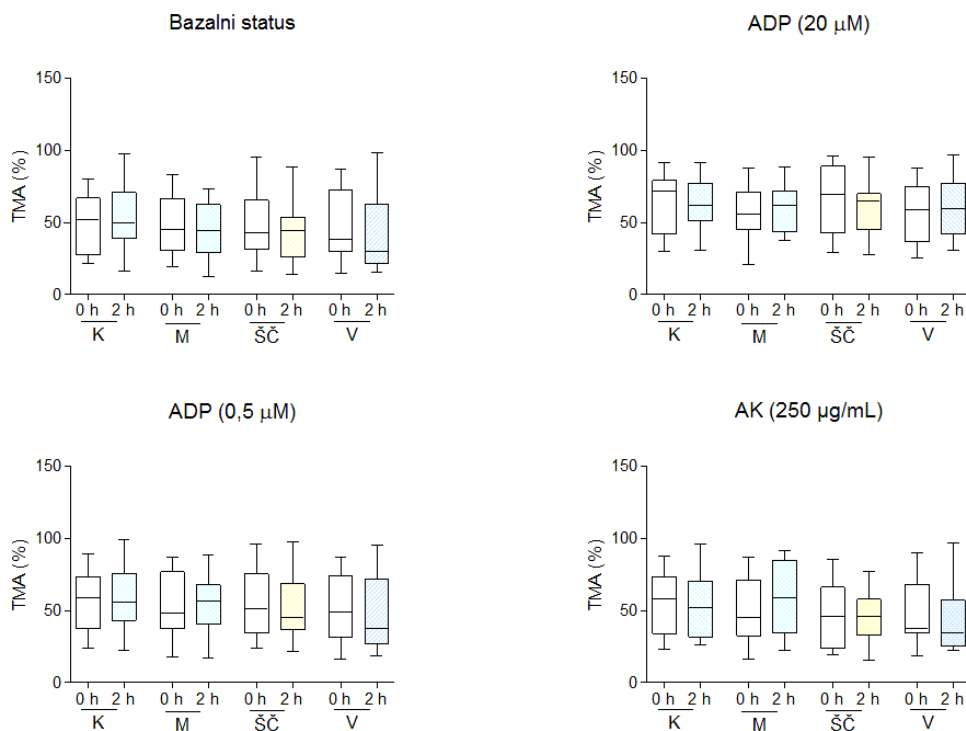


**Slika 27.** Procenat agregata trombocita i monocita (TMA) u ukupnoj populaciji monocita ispitanika sa metaboličkim sindromom, pre i 2h nakon konzumacije čaja od koprive (K), mirodije (M), šarplaninskog čaja (ŠČ) i tople vode (V). Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima;

*Uticaj konzumacije ispitivanih čajeva na agregaciju trombocita sa neutrofilima*

Određivanjem procenata agregata trombocita i neutrofila (TNA) u ukupnoj populaciji neutrofila (min. n = 10000), u nestimulisanim uzorcima i uzorcima stimulisanim odgovarajućim agonistima i statističkom analizom dobijenih podataka primenom Wilcoxon-ovog testa, pokazano je da konzumacija ispitivanih čajeva, kao ni tople vode kao kontrole, nije značajno uticala na agregaciju trombocita sa neutrofilima. Dobijene vrednosti u sve četiri interventne grupe prikazane su slici 28.

Kao i u pogledu TMA intervencija nije značajno uticala na procenat TNA u uzorcima tretiranim ASK pre delovanja AK kao agonista.



**Slika 28.** Procenat agregata trombocita i neutrofila (TNA) u ukupnoj populaciji neutrofila, pre i 2h nakon konzumacije čaja od koprive (K), mirođije (M), šarplaninskog čaja (ŠČ) i tople vode (V). Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima

### 4.3.3. Uticaj jednokratne konzumacije soka od nara na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima

Uticaj jednokratne konzumacije soka od nara na aktivaciju trombocita i njihovu agregaciju sa monocitima i neutrofilima ispitivan je u okviru randomizirane, kontrolisane studije paralelnog dizajna, kod ispitanika sa metaboličkim sindromom.

Osnovne karakteristike grupe ispitanika, uključujući vrednosti antropometrijskih i biohemijskih parametara u serumu ukupne populacije ispitanika, kao i ispitanika u pojedinim interventnim grupama, prikazane su u Tabelama 26 i 27

**Tabela 26.** Osnovne karakteristike, antropometrijski parametri i vrednosti krvnog pritiska u ukupnoj populaciji ispitanika, interventnoj i kontrolnoj grupi

Karakteristike	Ukupno	Sok od nara	Voda	P - vred.
Broj ispitanika	40	20	20	-
Pol (M / Ž)	21/ 19	10 / 10	11 / 9	-
Starost	53,7 ± 6,23	55,4 ± 5,11	52,47 ± 6,77	0,427
Obim struka (cm)	99,05 ± 11,28	100,93 ± 10,44	98,23 ± 9,65	0,827
ITM (kg/m <sup>2</sup> )	28,29 ± 3,96	29,47 ± 3,65	28,59 ± 3,76	0,785
Sistolni krvni pritisak (mmHg)	130,38 ± 14,98	127,92 ± 20,59	134,86 ± 10,98	0,405
Dijastolni krvni pritisak (mmHg)	82,27 ± 10,01	83,46 ± 7,40	86,29 ± 10,16	0,391

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D.; statistička značajnost između grupa analizirana Analizom varijanse (ANOVA)

Kao i u studiji ispitivanja delovanja čajeva, s obzirom na osnovni kriterijum za uključivanje u studiju koji je definisan kao prisustvo metaboličkog sindroma, i u ovoj studiji postojala je inter-individualna varijacija u zastupljenosti pojedinih faktora rizika između ispitanika. Prikazani parametri imali su normalnu distribuciju i rezultati ANOVA testa pokazali su da nije postojala statistički značajna razlika u antropometrijskim parametrima, vrednostima sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska i biohemijskim parametrima u grupi koja je konzumirala sok od nara i kontrolnoj grupi koja je konzumirala toplu vodu.

**Tabela 27.** Vrednosti biohemijskih parametara u serumu u ukupnoj populaciji ispitanika, interventnoj i kontrolnoj grupi

Parametar	Ukupno	Sok od nara	Voda	p -vred.
Glukoza (mmol/l)	5,22 ± 1,05	5,12 ± 0,65	5,34 ± 1,40	0,706
Ukupni kolesterol (mmol/l)	5,96 ± 1,03	6,03 ± 1,00	5,86 ± 1,08	0,936
LDL kolesterol (mmol/l)	1,35 ± 0,32	1,33 ± 0,35	1,39 ± 0,29	0,424
HDL kolesterol (mmol/l)	3,87 ± 0,94	3,95 ± 0,91	3,77 ± 0,98	0,954
Trigliceridi (mmol/l)	1,55 ± 0,84	1,61 ± 0,87	1,49 ± 0,83	0,828

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D.; statistička značajnost između grupa analizirana ANOVA testom

Parametri krvne slike koji se odnose na trombocite u ukupnoj populaciji ispitanika i kod ispitanika u pojedinim interventnim grupama prikazani su u Tabeli 28. ANOVA je pokazala da ni u vrednostima ovih parametara nije postojala statistički značajna razlika između interventnih grupa.

**Tabela 28.** Broj trombocita i srednja vrednost zapremine trombocita (MPV) u ukupnoj populaciji ispitanika, interventnoj i kontrolnoj grupi

Karakteristike	Ukupno	Sok od nara	Voda	p -vred.
Broj trombocita (x 10 <sup>9</sup> /L)	257,4 ± 65,7	264,9 ± 82,9	252,2 ± 51,7	0,835
MPV (fl)	7,9 ± 0,9	8,1 ± 1,2	7,8 ± 0,8	0,443

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D.; statistička značajnost između grupa analizirana ANOVA testom

Ispitivani parametri funkcije trombocita određivani su u bazalnim uslovima, odnosno u nestimulisanim uzorcima krvi i nakon *in vitro* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata (ADP), pre i 2h nakon konzumacije soka od nara ili tople vode

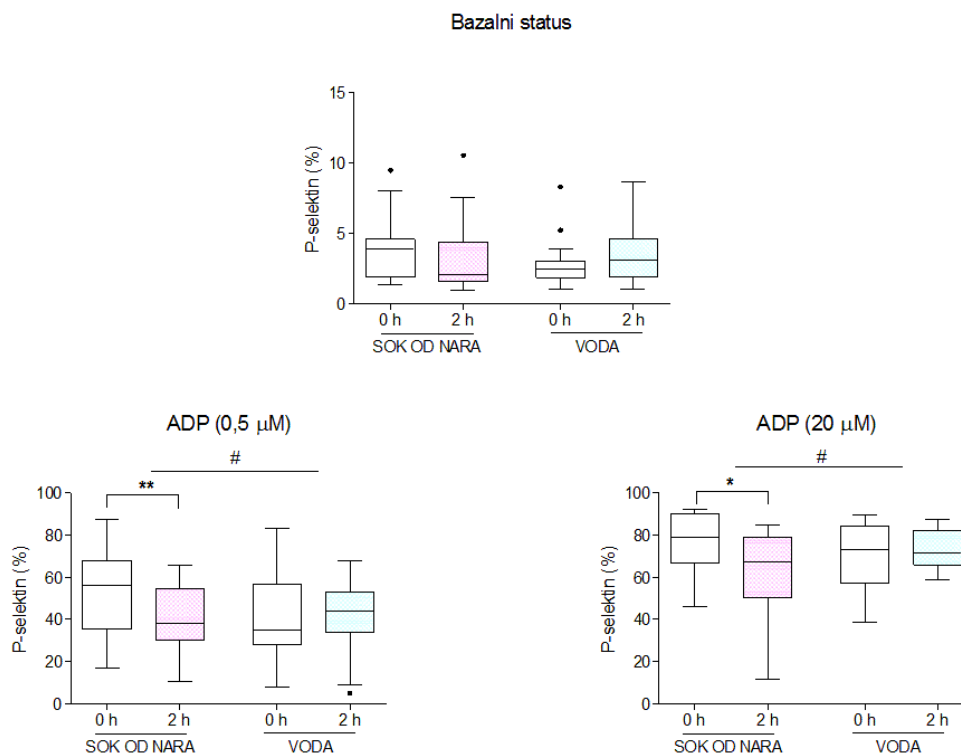
Primenom neparametarske analize rezultata ponovljenih merenja (Vilkoksonov test označenih rangova) ispitivan je uticaj svake od intervencija. Analiza apsolutnih promena u vrednostima analiziranih parametara nakon dijetarne ili kontrolne

intervencije, izvršena je primenom Mann Whitney-jevog U testa. Kriterijum za statistički značajnu promenu u oba testa je iznosio  $p < 0,05$ .

*Uticao konzumacije soka od nara na ekspresiju P-selektina*

Kao parametri ekspresije P-selektina određivani su procenat P-selektin-pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita ( $n=20000$ ) i srednja vrednost gustine P-selektina na pojedinačnim trombocitima. Dobijeni rezultati poređeni su sa rezultatima dobijenim u kontrolnoj grupi, koja je konzumirala toplu vodu.

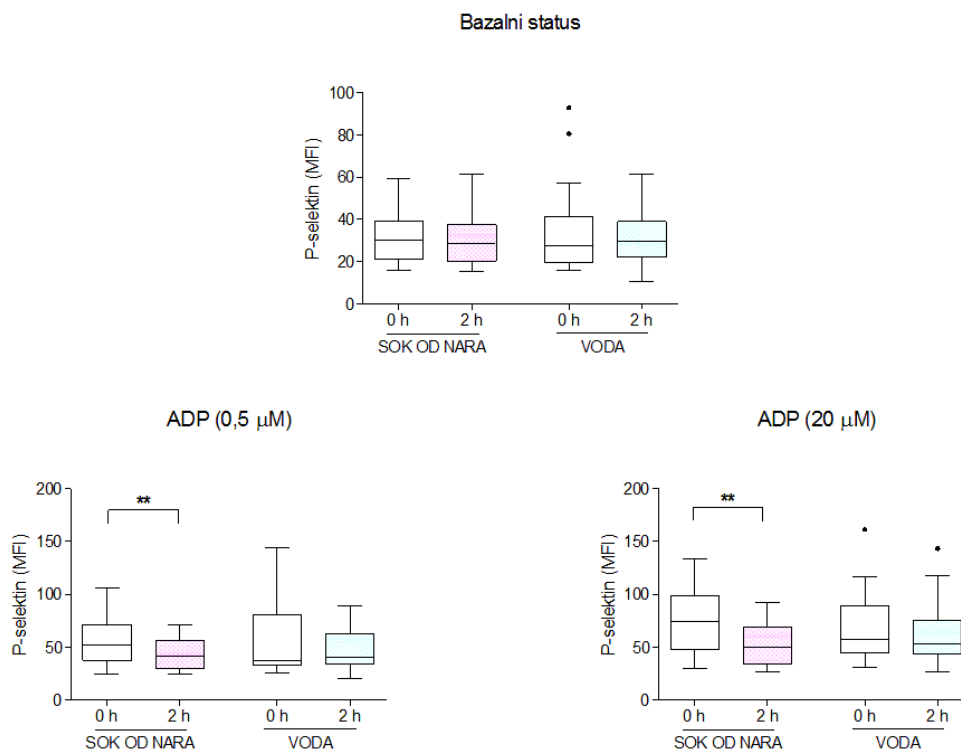
Vrednosti procenata P-selektin-pozitivnih trombocita u interventnoj i kontrolnoj grupi, pre i posle konzumacije, prikazane su na Slici 29.



**Slika 29.** Procenat P-selektin pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita ispitanika sa metaboličkim sindromom, pre i 2h nakon konzumacije soka od nara i vode. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova); statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu grupu: #  $p < 0,05$ ; (Man-Vitnijev U test)

Neparametarska analiza rezultata Vilkoksonov testom označenih rangova pokazala je da u bazalnim uslovima nije bilo statistički značajnog efekta konzumacije soka od nara na procenat P-selektina. Takođe, nije uočena ni promena pri konzumaciji vode. U uzorcima koji su tretirani suboptimalnim i optimalnim koncentracijama ADP kao agonista aktivacije trombocita, uočen je značajan uticaj konzumacije soka od nara, dok to nije bio slučaj kod konzumacije vode. Poređenjem promena vrednosti analiziranog parametra nakon konzumacije u odnosu na vrednosti pre konzumacije između interventne i kontrolne grupe Man Vitnijevim testom, pokazano je da postoji statistički značajna razlika.

Vrednosti gustine P-selektina na trombocitima prikazane su na Slici 30.



**Slika 30.** Gustina P-selektina na pozitivnim trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom, pre i 2h nakon konzumacije soka od nara i vode. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova);

Statističkom analizom dobijenih parametara pokazan je sličan efekat konzumacije soka od nara na gustinu P-selektina na trombocitima. Naime, u bazalnim uslovima dijetarna intervencija nije značajno uticala na vrednost ovog markera aktivacije, dok je u uzorcima izloženim agonističkom delovanju ADP-a i u

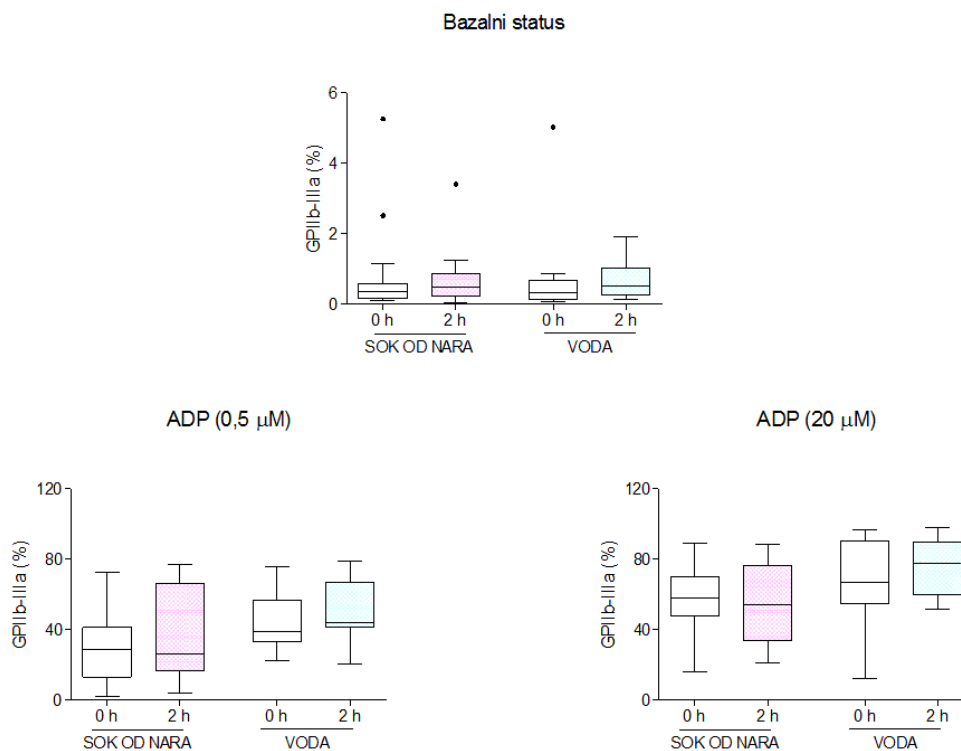


suboptimaloj, i u optimalnoj koncentraciji došlo do statistički značajnog smanjenja gustine. Nakon konzumacije vode nije došlo do statistički značajne promene. Poređenjem promena koje su nastale nakon konzumacije soka ili vode, pokazano je da te promene nisu bile statistički značajno različite.

*Uticaj konzumacije soka od nara na ekspresiju GPIIb-IIIa*

Kao parametri ekspresije P-selektina određivani su procenat GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita (n=20000) i srednja vrednost gustine GPIIb-IIIa na pojedinačnim trombocitima. Dobijeni rezultati poređeni su sa rezultatima dobijenim u kontrolnoj grupi koja je konzumirala vodu.

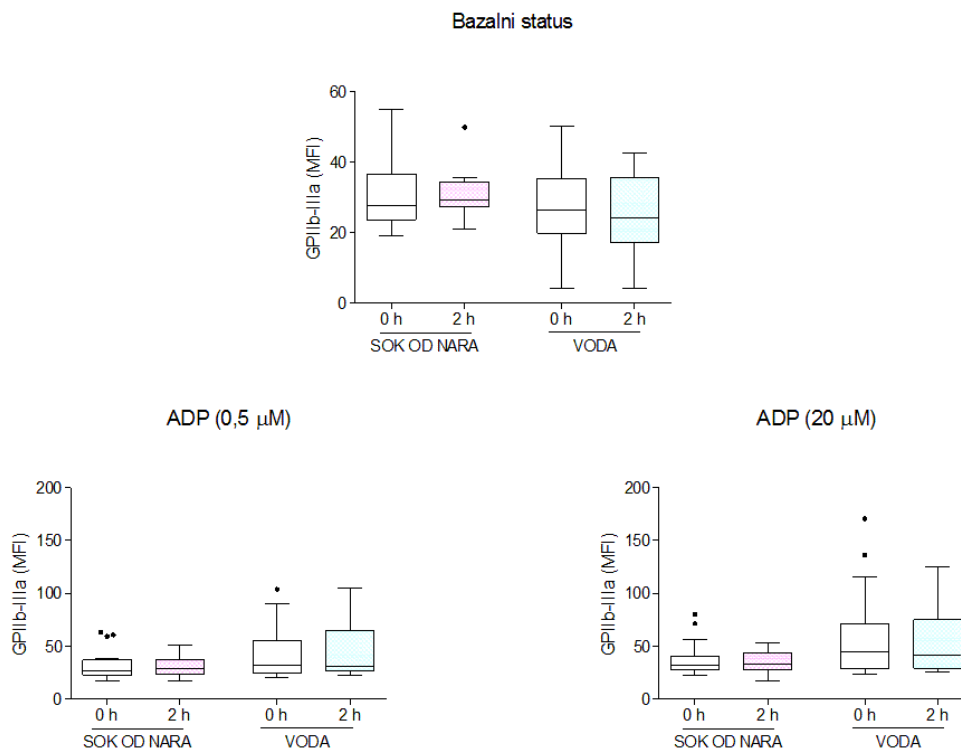
Vrednosti procenata P-selektin-pozitivnih trombocita u interventnoj i kontrolnoj grupi, pre i posle konzumacije prikazane su na slici 31.



**Slika 31.** Procenat GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u ukupnoj populaciji trombocita ispitanika sa metaboličkim sindromom, pre i 2h nakon konzumacije soka od nara i vode. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima

Vilkoksonov neparametarski test pokazao je da 2h nakon konzumacije soka od nara nije došlo do statistički značajne promene u procentu GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita, kao ni u gustini ovih receptora na površini trombocita, prikazanih na slici

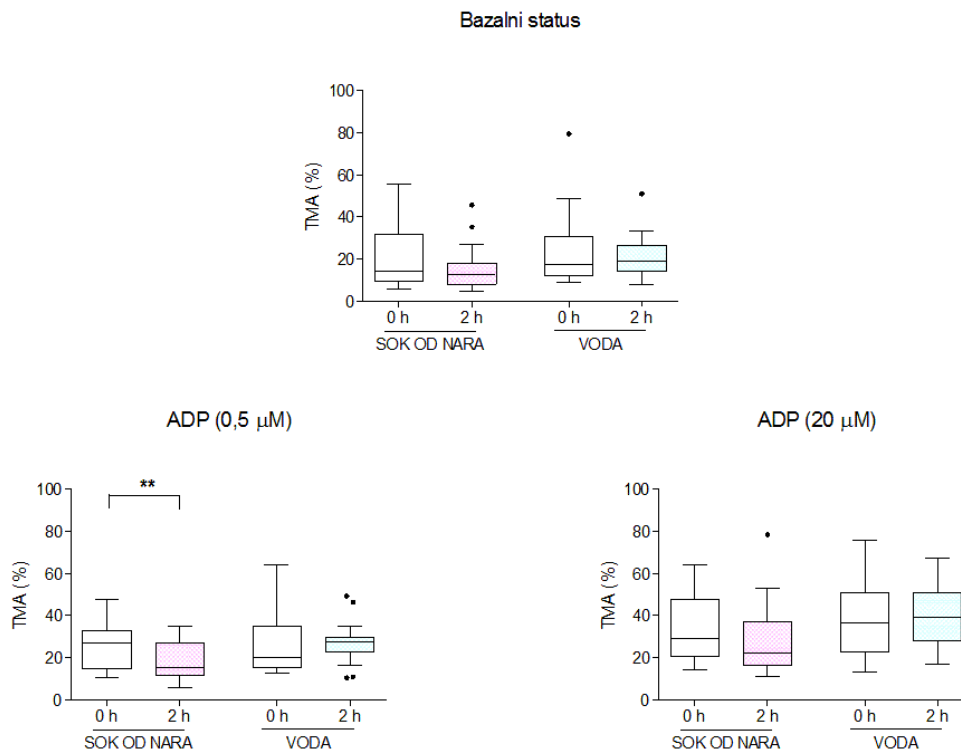
30, kako u nestimuliranim uzorcima tako i uzorcima stimuliranim delovanjem niže i više koncentracije ADP-a.



**Slika 32.** Gustina GPIIb-IIIa na pozitivnim trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom, pre i 2h nakon konzumacije soka od nara i vode. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima

*Uticaj konzumacije soka od nara na agregaciju trombocita sa monocitima*

Neparametarsko statističkom analizom ponovljenih merenja nije pokazan značajan efekat konzumacije soka od nara na bazalne vrednosti procenta agregata trombocita i monocita, ali je u uzorcima tretiranim suboptimalnim koncentracijama ADP-a došlo do značajnog smanjenja nakon dijetarne intervencije, u odnosu na vrednosti u tretiranim uzorcima pre intervencije. Razlike koje su dobijene nakon intervencije nisu značajno raličite od razlika u kontrolnoj grupi (Man-Vitnijev test). Efekat konzumacije soka od nara na agregaciju trombocita sa monocitima, izazvan delovanjem optimalnih koncentracija ADP-a nije pokazan ni u interventnoj, ni u kontrolnoj grupi. Dobijene vrednosti procenta agregata trombocita i monocita u ukupnoj populaciji monocita prikazane su na Slici 33.

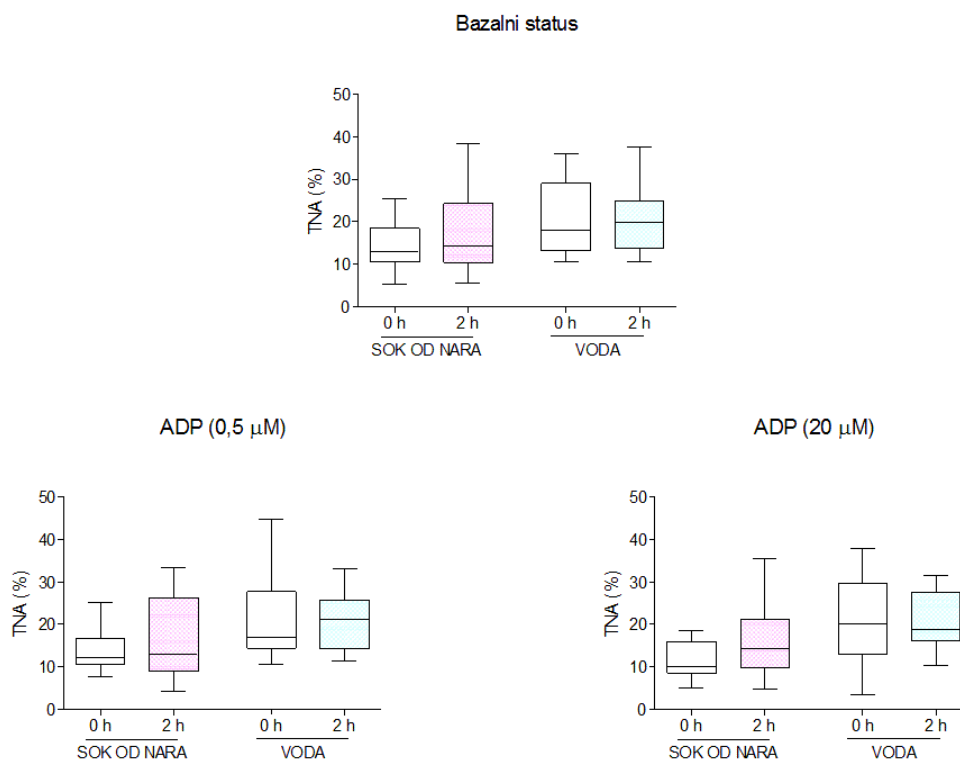


**Slika 33.** Procenat agregata trombocita i monocita (TMA) u ukupnoj populaciji monocita, pre i 2h nakon konzumacije soka od nara i vode. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*\*  $p \leq 0,01$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova)

*Uticaj konzumacije soka od nara na agregaciju trombocita sa neutrofilima*

Vrednosti procenata agregata trombocita i neutrofila u ukupnoj populaciji neutrofila, pre i posle konzumacije soka od nara i vode kao kontrole, u nestimulisanim uzorcima i uzorcima stimulisanim suboptimalnim i optimalnim koncentracijama ADP-a prikazani su na slici 34.

Analizom dobijenih vrednosti Vilkoksonovim testom nije pokazan značajan uticaj konzumacije soka od nara na agregaciju trombocita sa neutrofilima, ni u jednom od definisanih eksperimentalnih uslova.



**Slika 34.** Procenat agregata trombocita i neutrofila (TNA) u ukupnoj populaciji neutrofila, pre i 2h nakon konzumacije soka od nara i vode. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramima

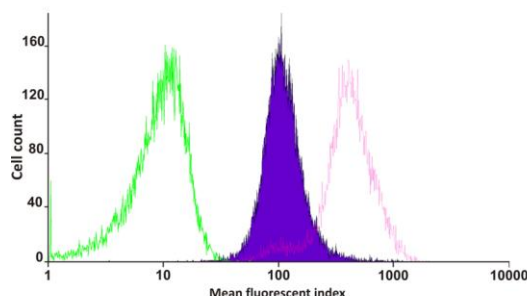
#### 4.4. UTICAJ ISPITIVANIH BILJNIH EKSTRAKATA NA NIVO REAKTIVNIH VRSTA KISEONIKA U ĆELIJAMA IZLOŽENIM DELOVANJU PROOKSIDANASA ILI AGONISTA

##### 4.4.1. Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, nara, kelja, japanske jabuke i aronije na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u eritrocitima izloženim delovanju vodonik-peroksida

*Uticaj ekstrakta koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, nara, kelja, japanske jabuke i aronije na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u eritrocitima izloženim delovanju vodonik-peroksida*

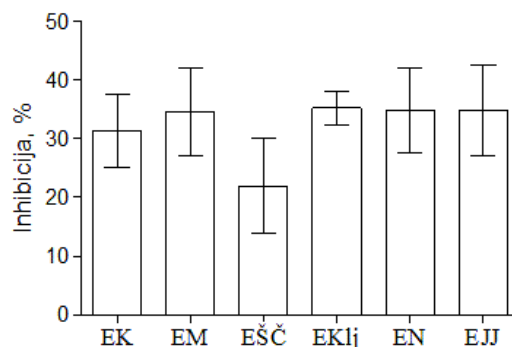
Kao ćelijski model za ispitivanje antioksidativnog delovanja bioaktivnih sastojaka koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, nara, kelja i japanske jabuke korišćeni su eritrociti izolovani iz krvi 6 zdravih ispitanika.

Izolovani eritrociti tretirani su ispitivanim ekstraktima u finalnoj koncentraciji od 200 $\mu$ g/ml u trajanju od 30 min, a zatim izloženi umerenom oksidativnom stresu, delovanjem vodonik peroksida (1 mM). Nivo vodonik peroksida u ćelijama određivan je metodom protočne citometrije, nakon bojenja ćelija 2',7'-dihloro-fluorescein diacetatom (DHFDA), na osnovu fluorescencije dihlorofluoresceina (DHF), proizvoda reakcije DHFDA sa vodonik peroksidom. Na Slici 35. prikazan je reprezentativni histogram fluorescencije u eritrocitima tretiranim ekstraktom kelja pre delovanja prooksidansa, u poređenju sa kontrolnim ćelijama izloženim delovanju vodonik peroksida i netretiranim ćelijama.



**Slika 35.** Reprezentativni histogram fluorescencije (horizontalna osa) u netretiranim eritrocitima (zelena kontura), eritrocitima pretretiranim metanolnim ekstraktom kelja (200 $\mu$ g/mL) i nakon toga tretiranim vodonik peroksidom (plava površina) i eritrocitima tretiranim samo vodonik peroksidom (roze kontura)

Srednja vrednost intenziteta fluorescencije – MFI (od *eng. mean fluorescence intensity*) ukupnog broja analiziranih eritrocita (n=20000) pomenjena ka manjim vrednostima u ćelijama tretiranim ekstraktom pre delovanja prooksidansa, u odnosu na fluorescenciju ćelija izloženih samo delovanju prooksidansa, ukazuje na smanjen nivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u ćelijama, odnosno antioksidativno delovanje odgovarajućeg ekstrakta.



**Slika 36.** Smanjenje nivoa vodonik-peroksida u eritrocitima izloženim delovanju ekstrakata koprive (EK), mirođije (EM), šarplaninskog čaja (EŠČ), kelja (EKlj), nara (EN) i japanske jabuke (EJJ) i nakon toga tretiranih vodonik-peroksidom, u odnosu na kontrolne ćelije tretirane DMSO-om i vodonik-peroksidom;

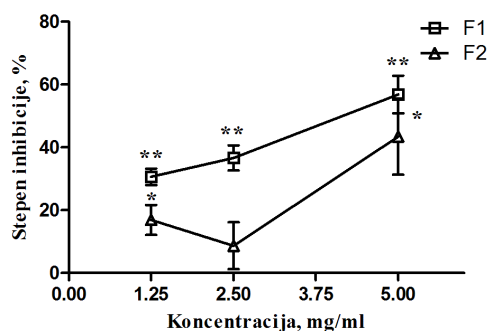
Dobijene vrednosti inhibicije (Slika 36) poređene su sa vrednostima njihovog antiradikalnog potencijala određenog DPPH testom i nije uočena značajna korelacija ( $p = 0,231$ ).

U svakom slučaju pokazani rezultati ukazuju da i u biološkim sistemima ispitivani ekstrakti ipak ispoljavaju određen stepen antioksidativnog delovanja.

*Uticaj ekstrakta aronije i protokatehnične kiseline na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u eritrocitima izloženim delovanju vodonik-peroksida*

Kao ćelijski model za ispitivanje antioksidativnog delovanja bioaktivnih sastojaka ploda aronije korišćeni su eritrociti izolovani iz krvi 4 ispitanika sa metaboličkim sindromom. Ispitivane su dve frakcije etanolno-vodenog (60% v/v) ekstrakta ploda aronije, metanolna frakcija (F1) i vodena frakcija (F2), u koncentracijama 1,25; 2,5 i 5 mg/mL, izražene na masu početnog etanolno-vodenog ekstrakta. Izolovani eritrociti tretirani su serijom razblaženja ispitivanih frakcija u trajanju od 30 min, a zatim izloženi umerenom oksidativnom stresu, delovanjem vodonik peroksida (1 mM). Nivo vodonik peroksida u eritrocitima određivan je metodom protočne citometrije, nakon bojenja ćelija 2',7'-dihloro-fluorescein diacetatom

(DHFDA), na osnovu fluorescencije proizvoda reakcije DHFDA sa vodonik peroksidom.

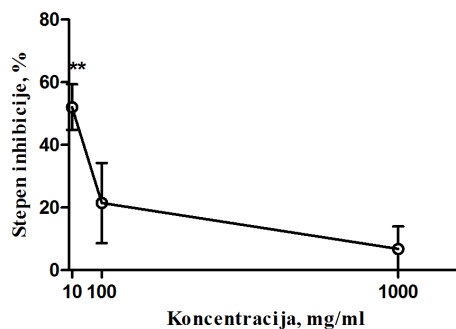


**Slika 37.** Smanjenje nivoa vodonik-peroksida u eritrocitima izloženim delovanju različitih koncentracija metanolne frakcije (F1) i vodene frakcije (F2) etanolno-vodenog ekstrakta ploda aronije i nakon toga tretiranih vodonik-peroksidom. Rezultati su izraženi kao % promene u odnosu na kontrolne ćelije tretirane vodonik-peroksidom i predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D.; statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (Studentov t-test).

Na osnovu dobijenih rezultata, prikazanih na Slici 37 kao procenat redukcije MFI u ćelijama pretretiranim pre delovanja vodonik peroksida u odnosu na nepretretirane, može se zaključiti da obe frakcije ekstrakta aronije (F1 i F2) pokazuju statistički značajno, dozno-zavisno antioksidativno delovanje u ispitivanom ćelijskom modelu. Proceni smanjenja vrednosti MFI pri delovanju metanolne frakcije u koncentracijama od 1.25, 2.5 i 5 mg/mL iznosili su redom  $30.65 \pm 2.61$  %,  $36.67 \pm 3.98$  % i  $56.83 \pm 5.96$  %, dok je za iste koncentracije vodene frakcije smanjenje bilo manje izraženo i iznosilo  $16.89 \pm 4.78$  %,  $8.69 \pm 7.45$  % i  $43.42 \pm 12.08$  % u odnosu na kontrolu.

Veći stepen značajnosti pokaznog efekta frakcije sa većim sadržajem antocijana (F1) ukazuje na činjenicu da antocijani doprinose antioksidativnom potencijalu ispitivanog ekstrakta.

U istim eksperimentalnim uslovima, na eritrocitima izolovanim iz krvi istih ispitanika kao ćelijskom modelu, ispitivano je i antioksidativno delovanje tri različite koncentracije protokatehnične kiseline (10, 100 i 1000  $\mu\text{M}$ ). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 38.



**Slika 38.** Smanjenje nivoa vodonik-peroksida u eritrocitima izloženim delovanju različitih koncentracija protokatehuične kiseline i nakon toga tretiranih vodonik-peroksidom, u odnosu na kontrolne ćelije tretirane vodonik-peroksidom; statistički značajno različito u odnosu na kontrolu: \*\* $p < 0.01$  (Studentov t-test).

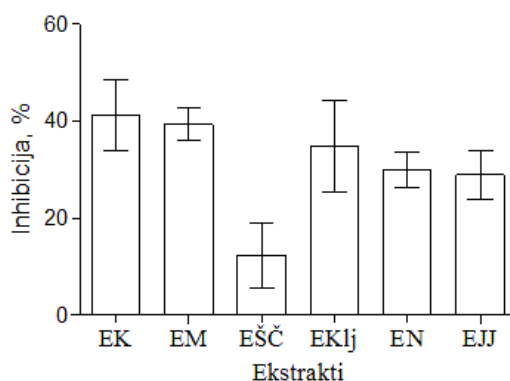
Na osnovu dobijenih rezultata pokazana je obrnuto dozno-zavisna antioksidativna zaštita eritrocita delovanjem protokatehuične kiseline i statistički značajno smanjenje nivoa vodonik-peroksida uočeno je samo pri delovanju najniže ispitivane koncentracije od 10  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.0065$ ), koja je dovela do smanjenja od  $52.09 \pm 7.29\%$  u odnosu na kontrolne ćelije.



#### 4.4.2. Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, nara, kelja i japanske jabuke na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima izloženim delovanju adenozin-difosfata

Delovanje ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke, i ispitivanih metabolita: na nivo reaktivnih vrsta kiseonika indukovanih delovanjem ADP-a, ispitivano je na trombocitima izolovanim iz krvi 6 zdravih ispitanika.

Trombociti su inkubirani sa ispitivanim ekstraktima (200  $\mu\text{g/ml}$ ) ili DMSO-om kao kontrolom i nakon toga tretirani rastvorom adenozin-difosfata. (40  $\mu\text{M}$ ). Nivo reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima određivan je metodom protočne citometrije, nakon bojenja ćelija 2',7'-dihloro-fluorescein diacetatom (DHFDA), na osnovu fluorescencije nastalog proizvoda 2',7'-dihloro-fluoresceina, u reakciji DHFDA sa vodonik peroksidom.

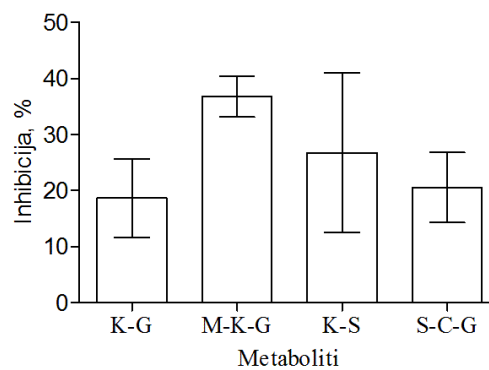


**Slika 39.** Smanjenje nivoa reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima izloženim delovanju ekstrakata koprive (EK), mirođije (EM), šarplaninskog čaja (EŠČ), kelja (EKlj), nara (EN) i japanske jabuke (EJJ) nakon toga tretiranih adenozin difosfatom, u odnosu na kontrolne ćelije tretirane adenozin difosfatom; rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$ SEM.

U kontrolnim uzorcima nakon delovanja agonista došlo je do blagog povećanja nivoa reaktivnih vrsta kiseonika, koji se manifestovao višestrukim povećanjem intenziteta fluorescence u odnosu na obojene ne-tretirane ćelije. Delovanjem ekstrakata došlo je do smanjenja intenziteta fluorescencije u poređenju sa kontrolnim ćelijama tretiranim agonistom. Procenti inhibicije nivoa reaktivnih vrsta kiseonika, nakon delovanja svakog

od ispitivanih ekstrakata, prikazani su na Slici 39. Važno je istaći da je delovanje ekstrakata na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima izloženim delovanju agonista, odgovaralo delovanju ekstrakata na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u eritrocitima izloženim delovanju prooksidanasa.

Uporedo sa ispitivanjem delovanja ekstrakata ispitivani su i efekti metabolita kvercetina i kao i efekti sulforafan-cistein-glicina. Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 40.

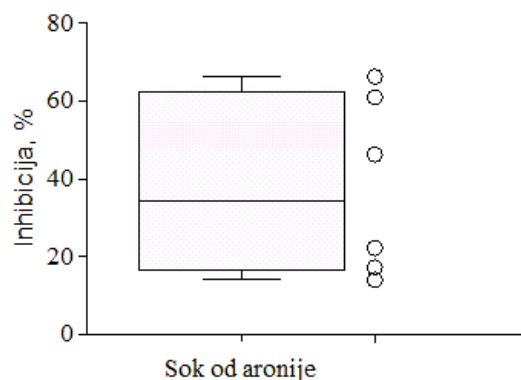


**Slika 40.** Smanjenje nivoa reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima izloženim delovanju metabolita kercetin-3-glukuronida (K-G), 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida (M-K-G), kvercetin-3-sulfata (K-S) i sulforafan-cistein-glicina (S-C-G) i nakon toga tretiranih adenzin difosfatom, u odnosu na kontrolne ćelije tretirane adenzin difosfatom; rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$ SEM.

## 4.5. UTICAJ BILJNIH POLIFENOLA NA AGREGACIJU TROMBOCITA SA ENDOTELNIM I MALIGNIM ČELIJAMA

### 4.5.1. Uticaj konzumacije soka od aronije na adheziju trombocita za EA.hy 929 ćelije

Pored delovanja jednokratne konzumacije soka od aronije na aktivaciju trombocita ispitivan je i uticaj konzumacije ove namirnice na adheziju trombocita za endotelne ćelije, određivanjem adhezije trombocita, izolovanih iz pune krvi dobijene venepunkcijom pre konzumacije i 2h nakon konzumacije, za EA.hy 929 ćelije porekla iz vaskularnog endotela u prisustvu suboptimalnih koncentracija trombina (0,2 IU) kao agonista. Rezultati dobijeni u okviru pilot studije koja je uključivala 6 ispitanika sa metaboličkim sindromom prikazani su na Slici 41.



**Slika 41.** Inhibicija (%) adhezije humanih trombocita za EA.hy 929 ćelije u prisustvu trombina nakon konzumacije soka od aronije u odnosu na adheziju trombocita pre konzumacije. Rezultati su predstavljeni Tukijevim „box and whisker“ dijagramom; statistički značajno različito u odnosu na vrednosti pre konzumacije: \*  $p \leq 0,05$ ; (Vilkoksonov test označenih rangova).

Inhibicija adhezije trombocita izolovanih iz krvi ispitanika 2h nakon konzumacije za EA.hy 929 ćelije u kulturi u prisustvu trombina, u odnosu na adheziju trombocita izolovanih iz krvi pre konzumacije iznosila je  $37,83 \pm 22,64$  % ( $p = 0,028$ ). Uočeno je da je konzumacija soka od aronije dovela do inhibicije adhezije trombocita kod svih ispitanika, ali su istovremeno pokazane velike interindividualne razlike u efektu koje su se kretale između 14 and 67%.

#### 4.5.2 Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke na interakciju trombocita sa HeLa ćelijama

*Antiproliferativno delovanje sokova od maline, crne maline, crvene ribizle, crne ribizle, borovnice, aronije i nara*

Antiproliferativno delovanje soka od maline, crne maline, crvene ribizle, crne ribizle i borovnice ispitivano je na panelu malignih ćelija u kulturi: HeLa, Fem X, LS 174T, MCF-7 i PC-3 ćelijama, nakon 72h kontinuirane inkubacije ćelija sa ispitivanim sokovima, primenom KBR testa. Dobijeni rezultati, izraženi kao IC<sub>50</sub> vrednosti (μL/mL), odnosno koncentracije koje dovode do smanjenja preživljavanja malignih ćelija za 50% prikazani su u Tabeli 29.

**Tabela 29.** Koncentracije soka od maline (SM), crne maline (SCM), crvene ribizle (SCvR), crne ribizle (SCrR) i borovnice (SB) koje dovode do smanjenja preživljavanja malignih ćelija za 50% - IC<sub>50</sub> (μL/mL) određene KBR testom nakon 72h kontinuiranog delovanja sokova na maligne ćelije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija

Ćelijske linije	IC <sub>50</sub> (μL/mL)				
	SM	SCM	SCvR	SCrR	SB
HeLa	28.9 ± 1.9	43.4 ± 1.4	22.1 ± 1.2	13.6 ± 3.3	56.9 ± 1.9
Fem X	20.7 ± 0.9	37.4 ± 0.9	28.3 ± 1.9	13.6 ± 1.3	20.3 ± 1.7
LS 174T	18.4 ± 1.8	66.7 ± 2.1	21.1 ± 2.0	15.4 ± 2.3	58.7 ± 3.1
MCF-7	41.0 ± 0.3	61.6 ± 1.1	33.4 ± 1.5	26.8 ± 1.4	70.5 ± 3.9
PC 3	26.0 ± 2.2	60.8 ± 2.7	29.3 ± 1.8	10.2 ± 2.2	28.4 ± 3.5

Dobijeni rezultati na svim ćelijskim linijama pokazuju da ispitivani sokovi u značajnoj meri inhibiraju proliferaciju malignih ćelija u kulturi. Pokazano smanjenje preživljavanja ćelija u odnosu na kontrolu imalo je dozno-zavisni karakter.

Na svim ćelijskim linijama sok od crne ribizle je predstavljao najpotentniji inhibitor ćelijske proliferacije sa IC<sub>50</sub> vrednostima između 10,2 i 26,8 μL/mL, zavisno od ćelijske linije. Antiproliferativno delovanje soka od maline bilo je istog reda veličine sa delovanjem soka od crvene ribizle sa IC<sub>50</sub> vrednostima na LS 174, Fem X, HeLa i PC-3 ćelijama manjim od 30 μL/mL za oba ispitivana uzorka. Sok od borovnice pokazao je najslabije antiproliferativno delovanje sa IC<sub>50</sub> vrednostima u rasponu od 37.4 i 66.7 μL/mL. Najmanju osetljivost na delovanje ispitivanih sokova pokazale su

MCF-7 ćelije karcinoma dojke. Pokazana različita osetljivost ćelija različitog porekla u saglasnosti je sa literaturnim podacima (168, 169).

Dobijene IC<sub>50</sub> vrednosti za ispitivane sokove na odgovarajućim ćelijskim linijama analizirane su primenom neparametarskog Spirmanovog testa u pogledu potencijalne korelacije sa vrednostima ukupne kiselosti, sadržajem ukupnih fenola, sadržajem monomernih antocijana i antiradikalske aktivnosti ispitivanih sokova. Rezultati statističke analize prikazani su u Tabeli 30.

**Tabela 30.** Korelaciona analiza ukupne kiselosti (UK), sadržaja ukupnih fenola (UF), sadržaja monomernih antocijana (UMA), antiradikalske aktivnosti (ARA) i antiproliferativnog delovanja (IC<sub>50</sub>) ispitivanih sokova. Prikazani su korelacioni koeficijenti; statistički značajno \* $p < 0,05$  (Spearman-ov test korelacije)

Parametri	Antiproliferativno delovanje, IC <sub>50</sub> (μL/mL)				
	HeLa	Fem X	LS 174	MCF-7	PC 3
UK (%)	-0.915*	-0.681	-0.886*	-0.921*	-0.785
UF (mg GAE/100 mL)	0.261	-0.195	0.453	0.329	0.036
UMA (%)	0.910*	0.204	0.889*	0.935*	0.471
ARA (IC <sub>50</sub> mg/ml)	-0.130	0.198	-0.352	-0.210	-0.029

Sadržaj ukupnih polifenola nije statistički korelisao sa antiproliferativnim delovanjem, u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima dobijenim na uzorcima najčešće konzumiranog voća u SAD-u (170), iz čega se može zaključiti da je delovanje polifenolima bogatih ekstrakata na maligne ćelije najverovatnije nije uslovljeno polifenolnim karakterom prisutnih komponenata, već prisustvom specifičnog polifenolnog jedinjenja ili određene klase polifenola. Pokazana je značajna korelacija ukupne kiselosti i sadržaja monomernih antocijana sa antiproliferativnim delovanjem na HeLa, LS 174 i MCF-7 ćelije. Značajan doprinos organskih kiselina antiproliferativnoj aktivnosti ekstrakta brusnice pokazan je ranije (168). Dobijeni rezultati ukazuju da pored sadržaja organskih kiselina i sadržaj antocijana može biti dodatni parametar u proceni potencijalnog antiproliferativnog delovanja.

U skladu sa tim antiproliferativno delovanje sokova bogatih antocijanima, soka od aronije i soka od divljeg nara, ispitivano je na HeLa ćelijama kancera grlića materice i LS-174 ćelijama kancera kolona, u istim eksperimentalnim uslovima, primenom KBR eseja. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 31.

**Tabela 31.** IC<sub>50</sub> vrednosti (μL/mL) određene KBR testom nakon 72h kontinuiranog delovanja soka od aronije (SA) i soka od nara (SN) na maligne ćelije. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija

Ćelijske linije	IC <sub>50</sub> (μL/mL)	
	SA	SN
HeLa	18,56 ± 1,26	3,4 ± 1,4
LS 174T	28,78 ± 7,45	14,42 ± 3,78

*Antiproliferativno delovanje ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke*

Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke na proliferaciju ispitivan je nakon 72h kontinuirane inkubacije primenom KBR testa. Dobijeni rezultati, izraženi kao IC<sub>50</sub> vrednosti (μL/mL), odnosno koncentracije koje dovode do smanjenja preživljavanja malignih ćelija za 50% prikazani su u Tabeli 32.

**Tabela 32.** Koncentracije ekstrakta koprive (EK), mirođije (EM), šarplaninskog čaja (EŠČ), kelja (EKlj), nara (EN) i japanske jabuke (EJJ) koje dovode do smanjenja preživljavanja malignih ćelija za 50% - IC<sub>50</sub> (μg/mL) određene KBR testom nakon 72h kontinuiranog delovanja. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± standardna devijacija

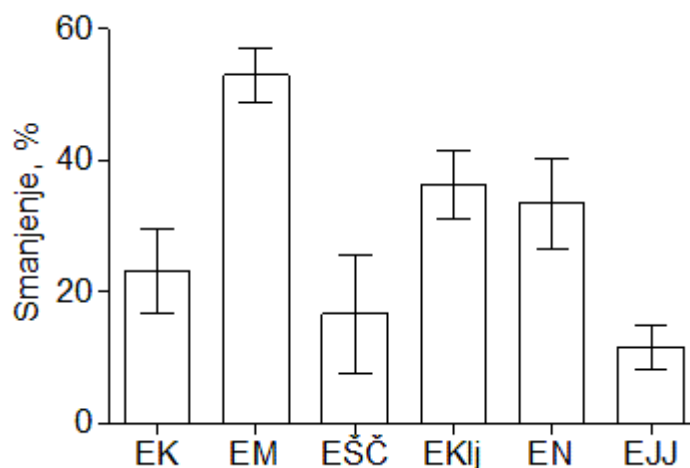
Ćelijske linije	IC <sub>50</sub> (μg/mL)					
	EK	EM	EŠČ	EKlj	EN	EJJ
HeLa	>200	172,3	>200	>200	56,4 ± 8,4	>200
LS 174T	>200	>200	>200	>200	88,9 ± 4,5	>200

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da izuzev ekstrakta nara ispitivani ekstrakti nemaju izraženu antiproliferativnu aktivnost.

Treba istaći da i pored pokazanih antiproliferativnih efekata ispitivanih ekstrakata na maligne ćelije u toku 72h inkubacije, kratkotrajna inkubacija u okviru ispitivanja antitrombocitnog i antioksidativnog delovanja nije dovela do promena u morfologiji, tj. veličini i granulaciji, korišćenih normalnih ćelija, eritrocita i trombocita, liziranih metodom protočne citometrije i shodno tome može se zaključiti da u ovom uslovima nije došlo do ispoljavanja citoksičnog delovanja.

*Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke na agregaciju trombocita zdravih osoba sa HeLa ćelijama*

Uticaj ispitivanih ekstrakata na proces agregacije trombocita i malignih ćelija u *in vitro* eksperimentalnim ćelijama ispitan je korišćenjem izolovanih trombocita zdravih osoba. Trombociti su inkubirani sa ispitivanim ekstraktima (200 µg/ml) ili DMSO-om kao kontrolom i nakon toga obeleženi pan-trombocitnom markerom CD61-PerCP i inkubirani sa prethodno obeleženim HeLa, ćelijama u prisustvu suboptimalnih koncentracija trombina (0,2 IU). Procenat trombocita formira agregate sa malignim ćelijama određivan je na osnovu odnosa CD61-PerCP+/calcein+ događaja u odnosu na ukupan broj trombocita CD61-PerCP događaja. Dobijeni rezultati izraženi kao smanjenje (%) procenta trombocita koji formira agregate nakon delovanja ispitivanih ekstrakata, u odnosu na procenat trombocita koji formira agregate u kontrolnom uzorku prikazani su na Slici 42.



**Slika 42.** Uticaj ekstrakta koprive (EK) mirođije (EM), šarplaninskog čaja (EŠĆ), kelja (EKlj), nara (EN) i japanske jabuke (EJJ) na procenat trombocita koji formiraju agregate sa HeLa ćelijama u prisustvu suboptimalne koncentracije trombina; Rezultati su izraženi kao smanjenje procenta trombocita izloženih delovanju ekstrakta u odnosu na procenat trombocita koji formira agregate u kontroli tretiranoj DMSO-om

Važno je istaći da nije uočena promena u broju agregata trombocita i malignih ćelija u populaciji malignih ćelija, ali je došlo do smanjenja broja trombocita koji stupa u interakciju sa malignim ćeljama, što se pokazalo i smanjenjem gustine trombocita na malignim ćelijama, procenjena na osnovu MFI vrednosti CD61 PerCP u populaciji malignih ćelija.

## DISKUSIJA

Povoljno delovanje namirnica biljnog porekla u prevenciji kardiovaskularnih i drugih hroničnih nezaraznih bolesti delom se pripisuje i delovanju polifenola, kao najzastupljenijih nenutritivnih, biološki aktivnih sastojaka ovih namirnica. S obzirom na ključnu ulogu trombocita u patogenezi kardiovaskularnih bolesti, povoljno delovanje namirnica bogatih polifenolima na funkciju trombocita, pokazano u velikom broju dijetarnih interventnih studija, predstavlja jedan od predloženih mehanizma povoljnog delovanja ishrane bogate ovim namirnicama na kardiovaskularno zdravlje.

I pored činjenice da najveći stepen naučne zasnovanosti povoljnog delovanja polifenolima bogatih namirnica pružaju rezultati interventnih studija, rezultati preliminarnih ispitivanja dobijeni u *in vitro* eksperimentalnim uslovima imaju značajnu ulogu, pre svega kao deo skrininga u odabiru potencijalnih kandidata, čije će delovanje biti potvrđeno u okviru interventnih studija, kao i pri ispitivanju potencijalnih mehanizama delovanja. Veliki broj tradicionalnih namirnica, o čijem delovanju na zdravlje ljudi postoji malo naučnih podataka, predstavlja dobar dijetarni izvor polifenola i sa predloženim potencijalnim delovanjem na funkciju trombocita.

Ispitivanjem delovanja ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke na funkciju trombocita pokazano je da svi ispitivani ekstrakti utiču na neki od parametara aktivacije ili agregacije trombocita indukovanih delovanjem arahidonske kiseline. Najizraženije delovanje ispoljili su ekstrakti mirođije i kelja, koji značajno smanjuju procenat trombocita koji ekspimiraju P-selektin i gustinu ovog receptora na trombocitima i zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom, dok je ekstrakt koprive pokazao isti efekat samo na trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom. Ekstrakti koprive, šarplaninskog čaja i japanske jabuke inhibirali su agregaciju trombocita zdravih ispitanika sa monocitima, indukovanu arahidonskom kiselinom, dok je agregacija sa neutrofilima inhibirana delovanjem ekstrakta šarplaninskog čaja kod zdravih ispitanika i ekstrakta koprive kod ispitanika sa metaboličkim sindromom.

Delovanje istih ekstrakata koprive, mirođije, kelja, šarplaninskog čaja, nara i japanske jabuke na funkciju trombocita zdravih osoba, ispitivano je uporedo sa istraživanjima prikazanim u doktorskoj disertaciji primenom automatskog analizatora funkcije trombocita (PFA-100) i dve kombinacije agonista, epinefrin-kolagen i ADP-



kolagen. Prikazani rezultati nisu pokazali značajno delovanje ispitivanih ekstrakata (116). Delimična odstupanja naših rezultata mogu se objasniti pre svega razlikom u korišćenim agonistima, kao i primenjenoj metodologiji, s obzirom da pored delovanja hemijskih agonista primena PFA-100 uključuje i agonističko delovanje „sila smicanja“, kao posledicu protoka krvi kroz kapilarne sudove (171). Primarna upotreba ove metodologije je procena uticaja na primarnu hemostazu, sa trombocitima kao jednim od činioca (172). Rezultati prikazani u ovoj tezi ukazuju na izraženiju interakciju ispitivanih ekstrakata sa agonističkim delovanjem arahidonske kiseline i u tom smislu prednost primene protočne citometrije u ispitivanju delovanja fitohemikalija usmerenim na trombocite. Dodatno, činjenica je da je i u našoj studiji pokazano da su trombociti zdravih osoba manje osetljivi na delovanje fitohemikalija od trombocita ispitanika sa faktorima rizika. Pored pomenutih, nema dostupnih naučnih podataka o uticaju kelja, njegovih ekstrakata ili očekivanih metabolita na funkciju trombocita. Dobijeni rezultati idu u prilog publikovanim podacima o delovanju sulforafana na funkciju trombocita. Sulforafan predstavlja degradacioni proizvod glukorafanina, glukozinolata prisutnog u velikom broju vrsta familije *Brassicaceae*, uključujući i kelj (131). Sulforafan je značajno inhibirao agonističko delovanje kolagena na procenat trombocita koji ekspimiraju GPIIb-IIIa (173). Ekstrakt alfa-alfe, još jedne vrste familije *Brassicaceae* bogate glukozinolatom, u koncentraciji od 1mg/ml, inhibirao je agregaciju trombocita indukovanu ADP-om za 73 % i agregaciju indukovanu kolagenom za 50%. Isti ekstrakt nije uticao na agregaciju indukovanu arahidonskom kiselinom i trombinom, merenu primenom optičke agregometrije. (174).

O delovanju mirođije ili ekstrakata ove biljke na funkciju trombocita nema podataka u dostupnoj literaturi, mada druge vrste familije *Apiaceae* imaju uticaj na aktivnost trombocita. Tretman izolovanih trombocita ekstraktom peršuna, u koncentracijama od 1-10 mg/mL, dovela je do dozno-zavisne inhibicije agregacije trombocita indukovane ADP-om, kolagenom, epinefrinom i trombinom (175). S obzirom na ulogu GPIIb-IIIa u homotipskoj agregaciji trombocita, naši rezultati su u skladu sa rezultatima Gadi-ja i saradnika. Posebno je značajno što su u našoj studiji pokazani efekti delovanja ekstrakta mirođije na ekspresiju aktivacionih markera delovanjem znatno nižih koncentracije ekstrakta mirođije, koje su bliže fiziološkim koncentracijama i koje se mogu postići dijetarnim unosom.

Osnovne biološki aktivne komponente nara su antocijani i elagitanini. Ekstrakti nara, kao i sokovi dobijeni ceđenjem iz arilusa, ispoljavaju delovanje na parametre

funkcije trombocita. Pokazano je da inkubacija plazme bogate trombocitima sa sokom od nara dovodi do dozno-zavisno inhibicije agregacije trombocita indukovane kolagenom čak do 90%. (176). U studiji Matiello i saradnika pokazano je da i sok i ekstrakt nara, u fiziološkim koncentracijama, inhibiraju agregaciju trombocita indukovanu kolagenom i arahidonskom kiselinom (177). Naši rezultati o inhibitornom delovanju ekstrakta nara na procenat GPIIb-IIIa-pozitivnih indukovanog delovanjem arahidonske kiseline, pokazanim kod ispitanika sa metaboličkim sindromom u skladu su sa podacima Matiello-a i saradnika, s obzirom na ulogu ovog adhezionog receptora u agregaciji trombocita. Delovanje ekstrakata biljaka roda *Sideritis* i *Dyospiros* na funkciju trombocita nije ranije istraživano.

Uticaoj ekstrakata koprive na agregaciju trombocita usled delovanja agonista, u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, ispitivan je ranije samo primenom optičke agregometrije U koncentraciji 10 mg/ml, ekstrakt koprive inhibirao je agregaciju trombocita indukovanu trombinom i ADP-om za 36,9% i 44,9% redom (119). U studiji Pierrie i saradnika liofilizovani ekstrakti suve i sveže koprive u koncentraciji od 1 mg/ml inhibirali su agregaciju trombocita indukovanu ADP-om za 36,9 % i 44,9 % (174). Važno je istaći da su koncentracije ekstrakata korišćenih u ovim studijama višestruko prevazilazile koncentracije koje su korišćene u našoj studiji i ne odgovaraju koncentracijama koje se mogu postići dijetarnim unosom.

Brojne studije pokazale su povoljno delovanje ekstrakata aronije na parametre funkcije trombocita u *in vitro* eksperimentalnm uslovima. Mehanizmi delovanja uključuju smanjenje stresa izazvanog reaktivnim vrstama kiseonika i azota (178-180), kao i uticaj na aktivaciju trombocita (181, 182). Delovanje ekstrakta ploda aronije inhibicijom ekspresije P-selektina pokazan je ranije. Luzak i saradnici pokazali su da ekstrakt aronije potencira inhibitorno delovanje HUVEC ćelija na ekspresiju P-selektina indukovanu ADP-om. Ovakav efekat, međutim, primećen je samo pri niskim koncentracijama ekstrakta (5µg/mL) (183). Postoji mogućnost da je odsustvo efekta visokih koncentracija ekstrakta aronije na ekspresiju P-selektina u okviru naše studije posledica „hormetičkog efekta“ prisutnih antocijana, analogno pokazanom „hormetičkom efektu“ polifenola i drugih sekundarnih metabolita biljaka u odnosu na njihovo antioksidativno delovanje (184). Uticaj na ekspresiju GPIIb-IIIa, kao odgovor na delovanje suboptimalne koncentracije ADP-a kao agonista, nije ranije ispitivan. I pored toga što nije uočena statistički značajna inhibicija agonističkog delovanja ADP-a na ekspresiju GPIIb-IIIa, do određenog stepena inhibicije, usled delovanja metanolne

frakcije u koncentraciji od 5mg/mL, došlo je u uzorcima krvi svih ispitanika, što ukazuje na mogućnost da ovo može biti još jedan od mehanizama antitrombocitnog delovanja bioaktivnih komponenata prisutnih u ekstraktu aronije.

Kao što je prethodno pomenuto, pored specifičnog delovanja pojedinih ekstrakata, dobijeni rezultati ukazuju i na generalno veću osetljivost trombocita ispitanika sa metaboličkim sindromom u odnosu na trombocite zdravih ispitanika, na njihovo delovanje. Efekti ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja manifestovali su se uticajem na veći broj parametara aktivacije i agregacije kod ispitanika sa metaboličkim sindromom, nego kod zdravih ispitanika, dok je ekstrakt nara pokazao delovanje samo kod ispitanika sa metaboličkim sindromom. Različite karakteristike trombocita zdravih ispitanika i ispitanika sa metaboličkim sindromom (31, 185) mogu biti uzrok primećenih razlika u delovanju između različitih populacija ispitanika i potencijalno ciljno mesto delovanja bioaktivnih komponenata hrane.

S obzirom na intenzivni metabolizam i malu bioraspoloživost polifenola u organizmu čoveka, opšte je prihvaćeno mišljenje da ispitivanje i potvrda biološkog delovanja polifenola u *in vitro* eksperimentalnim uslovima treba da budu zasnovani prvenstveno na delovanju njihovih metabolita i to u rasponu fizioloških koncentracija, koje je racionalno postići dijetarnim unosom polifenola (75). Ovakva istraživanja podrazumevaju poznavanje puteva apsorpcije i biotransformacije polifenola, ali ujedno i postojanje metoda za sintezu identifikovanih metabolita (186).

U okviru naših istraživanja ispitivan je uticaj tri osnovna metabolita flavonoida kvercetina (187), uticaj sulforafan-cistein-glicina, kao metabolita glukozinolata glukorafanina prisutnog u kelju (188) i uticaj protokatehnične kiseline, jednog od predloženih metabolita glikozida cijanidina (189). Među ispitivanim metabolitima najizraženije delovanje na markere aktivacije i agregacije trombocita pokazao je sulforafan-cistein-glicin, koji je značajno smanjio procenat trombocita koji ekspimiraju P-selektin i GPIIb-IIIa, kao i gustinu ovih receptora na trombocitima ispitanika sa metaboličkim sindromom, delujući istovremeno i na gustinu P-selektina i procenat GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita kod zdravih ispitanika. Ovaj konjugat sulforafana inhibirao je i agregaciju trombocita i neutrofila zdravih ispitanika indukovanu arahidonskom kiselinom. Efekti sulforafan-cistein-glicina na funkciju trombocita nisu ranije istraživani. U prilog dobijenim rezultatima su već pomenuti efekti sulforafana na ekspresiju GPIIb-IIIa (173). Važno je istaći da sulforafan i njegov konjugat sa cisteinom pokazuju slično delovanje i u pogledu indukcije enzima II faze detoksifikacije (188).

Pokazani uticaj na ekspresiju P-selektina, kod ispitanika sa rizikom za nastanak KVB, predstavlja originalni naučni doprinos.

Efekti metabolita kvercetina uglavnom su se ogledali na smanjenje gustine adhezionih receptora indukovanih arahidonskom kiselinom i jedino je 3'-metil-kvercetin-3-glukuronid pokazao inhibitorno delovanje na procenat GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita indukovanih arahidonskom kiselinom, kao i na inhibiciju agregacije trombocita i neutrofila.

Paralelno sa uticajem ekstrakata, uticaj istih metabolita ispitivan je u studiji Hollands i saradnika (116). Za razliku od rezultata naših istraživanja, prikazani rezultati pokazali su odsustvo delovanja ispitivanih metabolita kvercetina. Jedino je glutathion-cistein-glicin doveo do produžavanja vremena neophodnog za zatvaranje mikropore, kao parametra hemostatske uloge trombocita. Dodatnih podataka o delovanju ovih metabolita na funkciju trombocita nema u dostupnoj literaturi. Poznato je da oni poseduju antioksidativnu aktivnost (190), kojom se objašnjava uticaj namirnica koje su dijetarni izvor kvercetina na antioksidativni status.

Literaturni podaci o antitrombocitnom delovanju protokatehnične kiseline pokazuju da ona selektivno inhibira aktivaciju i agregaciju trombocita indukovanu delovanjem „silama smicanja“ kao posledice protoka krvi kroz sudove malih promera, ali ne ispoljava delovanje na aktivaciju i agregaciju indukovanu ADP-m i drugim endogenim agonistima (kolagen, trombin). Pretpostavljeni mehanizam delovanja je blokada vezivanja vWF za aktivirani glikoprotein Ib (191). Predloženo antitrombocitno delovanje protokatehnične kiseline nije potvrđeno rezultatima naših istraživanja, što ukazuje na odsustvo efekta na aktivaciju indukovanu delovanjem arahidonske kiseline. Treba naglasiti da su ispitivane koncentracije bile relativno visoke u odnosu na bioraspoloživost ovog metabolita (192) i da dobijeni rezultati ne isključuju potencijalne efekte fizioloških koncentracija, naročito s obzirom na inverznu doznu-zavisnost antioksidativnog delovanja, pokazanu u okviru naših istraživanja.

Većina do sada publikovanih studija o delovanju ekstrakata biljaka na funkciju trombocita zasniva se na određivanju parametara funkcije trombocita nakon delovanja visokih koncentracija agonista, korišćenjem optičke agregometrije. Visoke koncentracije agonista ne predstavljaju realističan prikaz fiziološke funkcije trombocita, a pokazano je da pored uticaja na funkciju trombocita značajno deluju i na ostale krvne ćelije (193, 194). Prednost primene protočne citometrije je korišćenje znatno nižih koncentracija agonista u praćenju precizne modulacije parametara aktivacije i

heterotipske agregacije delovanjem fitohemikalija. Može se zaključiti da protočna citometrija predstavlja dovoljno osetljivu metodu za procenu modulacije ekspresije površinskih receptora, koji ne rezultuju uvek adhezijom usled delovanja velikog broja faktora, ali su važni markeri u proceni modulatornog delovanja preventivnih agenasa.

Pored delovanja ekstrakta aronije na funkciju trombocita u *in vitro* ekperimentalnim uslovima, uticaj ove namirnice, kao značajnog dijetarnog izvora polifenola, ispitan je i u okviru jednokratne, nekontrolisane dijetarne interventne studije, kod zdravih ispitanika. Dobijeni rezultati pokazuju da konzumacija soka od aronije dovodi do smanjenja aktivacije trombocita i to smanjenjem procenta P-selektin pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima, kao i smanjenjem procenta P-selektin-pozitivnih trombocita i gustine ovog receptora u uzorcima izloženim *ex vivo* delovanju suboptimalne koncentracije adenzin-difosfata (ADP) i arahidonske kiseline. Konzumacija soka od aronije dovela je i do povećane osetljivosti trombocita na inhibiciju agonističkog delovanja arahidonske kiseline delovanjem acetil-salicilne kiseline *in vitro*. Nakon konzumacije aronije došlo je do smanjenja procenta agregata trombocita i monocita, kao i procenta agregata trombocita i neutrofila, u bazalnim uslovima, kao i u uzorcima izloženim delovanju adenzin difosfata i arahidonske kiseline.

Uticaj konzumacije soka od aronije na ekspresiju aktivacionih markera i agregaciju sa leukocitima, kao i uticaj jednokratne konzumacije soka od aronije na bilo koji parametar funkcije trombocita nije ranije ispitan. Pokazano je ranije da dugotrajna suplementacija ekstraktom ploda aronije dovodi do inhibicije homotipske agregacije, određivane primenom optičke agregometrije, uporedo sa povoljnim delovanjem na ostale faktore uključene u proces formiranja trombova (145).

Jako je malo podataka u literaturi o akutnom delovanju dijetarnih izvora polifenola na ekspresiju P-selektina i GPIIb-IIIa na trombocitima, kao i agregaciju trombocita sa leukocitima. Uticaj jednokratne konzumacije napitka od kakaoa kao dijetarnog izvora polifenola, standardizovanog na 897 mg flavan-3-ola, ispitan je kod 30 zdravih ispitanika. Pokazano je da nakon konzumacije dolazi do značajnog smanjenja procenta P-selektin-pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima, kao i nakon *ex vivo* delovanja ADP, u koncentracijama od 20 i 100  $\mu\text{M}$ , ali nije pokazan efekat na epinefrinom indukovanu ekspresiju ovog aktivacionog markera. Nakon konzumacije došlo je do značajnog smanjenja procenta GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima, kao u uzorcima izloženim *ex vivo* delovanju 20  $\mu\text{M}$  ADP-a i 100  $\mu\text{M}$

epinefrina (86). Pokazani efekti praćeni su i smanjenjem broja mikropartikula porekla iz trombocita, kao parametra aktivacije trombocita i njom izazvane fragmentacije (195). Ista grupa istraživaća ispitivala je i delovanje dealkoholizovanog vina, standardizovanog na 2 mmol ekvivalenata galne kiseline, na markere aktivacije trombocita kod zdravih ispitanika. Do smanjenja ekspresije GPIIb-IIIa došlo je u uzorcima izloženim delovanju 100  $\mu$ M ADP-a, ali ne i nakon delovanja nižih koncentracija ovog agonista, kao i nakon delovanja epinefrina. Efekti na ekspresiju P-selektina nisu pokazani. Efekat akutne konzumacije napitka od kakaoa, kao izvora flavan-3-ola pokazan je i u pogledu delovanja na parametre agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima. Heptinstall i saradnici ispitivali su doznu-zavisnost akutnog delovanja napitaka od kakaoa, sa sadržajem od 380, 680 i 980 mg flavan-3-ola, na agregaciju trombocita sa monocitima i neutrofilima indukovanu kolagenom. Do smanjenja agregacije trombocita sa monocitima došlo je nakon unosa sve tri ispitivane kolićine flavan-3-ola, dok je agregacija trombocita sa neutrofilima smanjena nakon unosa 680 i 980 mg flavan-3-ola (89).

U skladu sa izloženim, rezultati dobijeni u okviru naše studije predstavljaju originalne podatke o akutnom delovanju soka od aronije na funkciju trombocita. Istovremeno, ovo su jedinstveni podaci o akutnom delovanju antocijanima bogatih namirnica na markere aktivacije trombocita i heterotipske agregacije, koje je poredivo sa delovanjem namirnica bogatih flavanolima. Od posebnog znaćaja je što su pokazani efekti na ekspresiju površinskih markera i pri agonistićkom delovanju sub-optimalnih koncentracija ADP-a, koje u većoj meri odgovaraju fiziološkim uslovima aktivacije trombocita u odnosu na visoke doze agonista koje se najćešće koriste u okviru razlićitih metoda za procenu funkcije trombocita.

Rezultati dobijeni u okviru pilot studije pokazali su da jednokratna konzumacija soka od aronije utiće na markere aktivacije trombocita i njihove agregacije sa leukocitima i nisu bili u saglasnosti sa rezultatima preliminarnih ispitivanja delovanja ekstrakta aronije i protokatehuićne kiseline. Ovo ukazuje na prednost interventnih studija u ispitivanju relevantnih bioloških efekata dijetarnih polifenola, s obzirom na intenzivan metabolizam i malu bioraspoloživost nativnih bioaktivnih komponenata prisutnih u ekstraktima.

Treba naglasiti da je procenat agregata trombocita u ispitivanoj grupi zdravih osoba, u nestimulisanim uzorcima, bio viši u odnosu na literaturne podatke (196, 197), što je verovatno posledica eksperimentalnih uslova koji su podrazumevali odrećeno

vreme inkubacije nestimuliranih uzoraka kao kontrolnih uzoraka za ispitivanje delovanja ASK, pre analize protočnom citometrijom. Literaturni podaci ukazuju da je agregacija trombocita sa leukocitima osetljivija na produženu inkubaciju u odnosu na ekspresiju aktivacionih markera kao odgovor na delovanje intrizičnih agonista (58), zbog čega pojedini autori smatraju ovaj parametar relevantnijim markerom aktivacije trombocita (161). U tom kontekstu, statistički značajno smanjenje procenta agregata trombocita i monocita nakon konzumacije soka od aronije posledica je povećane otpornosti trombocita na delovanje intrizičkih agonista, pre svega ADP-a i arahidonske kiseline.

Rezultati dobijeni u okviru ispitivanja delovanja ekstrakata biljaka, koje predstavljaju sastojke tradicionalnih namirnica, na funkciju trombocita, u *in vitro* eksperimentalnim uslovima kao dela predkliničkih ispitivanja, ukazali su na najizraženiji anti-trombocitni potencijal kelja, koprive, mirođije i šarplaninskog čaja. Delovanje koprive, mirođije i šarplaninskog čaja biljaka ispitivano je u sledećoj fazi istraživanja, kod ispitanika sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, u okviru jedнокratne, kontrolisane dijetarne intervencije, koja je podrazumevala konzumaciju čajeva od koprive, mirođije i šarplaninskog čaja. Iako je pokazao najizraženije delovanje, praćeno delovanjem metabolita prisutne fitohemikalije, kelj nije dalje ispitivan jer su pokazani efekti metabolita sulforafana ukazivali da je delovanje ekstrakata kelja bilo velikim delom posledica prisustva glukozinolata, koji nisu bili tema istraživanja.

Dobijeni rezultati pokazuju da od ispitivanih čajeva najizraženije delovanje na funkciju trombocita ima čaj od mirođije. Nakon konzumacije ovog čaja došlo je do smanjenja procenta P-selektin- pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima, kao i nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije ADP-a, do smanjenja gustine ovog adhezionog receptora u uzorcima izloženim delovanju optimalne koncentracije ADP-a, kao i do smanjenja procenta GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita u uzorcima tretiranim ADP-om u obe koncentracije. Konzumacija čaja od koprive dovela je do smanjenja procenta P-selektin-pozitivnih trombocita u uzorcima tretiranim optimalnom koncentracijom ADP-a, procenta GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima, smanjujući istovremeno i gustinu P-selektina u bazalnim uslovima. Konzumacija šarplaninskog čaja dovela je do smanjenja procenta GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima i do smanjenja P-selektin-pozitivnih trombocita u uzorcima tretiranim *ex vivo* suboptimalnom ADP-a. U bazalnim uslovima došlo je i do

zmanjenja gustine P-selektina na trombocitima. Konzumacija šarplaninskog čaja je jedina interventna namirnica u ovoj studiji koja je dovela do smanjenja procenta P-selektin-pozitivnih trombocita nakon delovanja arahidonske kiseline. Nijedan od ispitivanih čajeva nije uticao na procenat agregacije trombocita sa monocitima i neutrofilima.

O delovanju ispitivanih čajeva na funkciju trombocita nema dostupnih literaturnih podataka. Osnovna fenolna jedinjenja prisutna u nadzemnom delu koprive su kafena i jabučna kiselina, rutin, kvercetin i izokvercitrin (117, 198). Prethodno je pokazano, primenom optičke agregometrije, da jednokratna konzumacija 200 ml kafe (6%, w/v), kao najznačajnijeg dijetarnog izvora kafene kiseline, kod zdravih ispitanika dovodi do smanjene agregacije izolovanih trombocita indukovane arahidonskom kiselinom i kolagenom, ali ne i agregacije indukovane ADP-om. Efekat na kolagenom indukovanu agregaciju praćen je i smanjenom sintezom tromboksana B<sub>2</sub> u trombocitima (199). Za razliku od efekta konzumacije kafe, jednokratna konzumacija supe od crnog luka, kojom je obezbeđen unos 69 mg kvercetina, dovela je kod zdravih ispitanika do smanjenja kolagenom-indukovane agregacije izolovanih trombocita merene optičkom agregometrijom, ali bez pokazane statističke značajnosti i samo pri niskim koncentracijama agonista. Efekat na agregaciju praćen je značajnom inhibicijom fosforilacije tirozina, kao ključne komponente signalnih događaja uključenih u odgovor trombocita na stimulaciju kolagenom (100).

Pored polifenolnih jedinjenja, mirođija i šarplaninski čaj sadrže i etarsko ulje (167, 200). Iako efekti konzumacije namirnica koje sadrže etarsko ulje nisu do sada ispitivani, pokazano je da etarska ulja izolovana iz različitih biljaka dovode do inhibicije agregacije trombocita u *in vitro* eksperimentalnim uslovima, kao i da je to delovanje najverovatnije povezano sa sadržajem jedinjenja sa fenil-propanoidnom strukturom (201).

Iako slabije izraženo u odnosu na efekte soka od aronije, delovanje ispitivanih čajeva, čijom se jednokratnom konzumacijom obezbeđuje značajnije manji unos polifenola u odnosu na ispitivane sokove, pruža osnovu za dalja ispitivanja efekta dugotrajne konzumacije na funkciju trombocita, kao i ispitivanja uticaja na pokazanu fiziološku postprandijalnu aktivaciju trombocita i agregaciju sa leukocitima (44-47).

Kod ispitanika sa prisutnim faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, pored delovanja ispitivanih čajeva, u okviru nezavisne dijetarne intervencije ispitivano je i delovanje jednokratne konzumacije soka od nara na funkciju trombocita.



Konzumacija soka od nara dovela je do smanjenja procenta P-selektin-pozitivnih trombocita i gustine ovog receptora na trombocitima tretiranim *ex vivo* suboptimalnom i optimalnom koncentracijom ADP-a. Nije pokazan uticaj konzumacije soka od nara na ekspresiju P-selektina u bazalnim uslovima, kao ni uticaj na parametre ekspresije GPIIb-IIIa, u bilo kom od definisanih eksperimentalnih uslova. Uticaj konzumacije na ekspresiju P-selektina u trombocitima izloženim delovanju suboptimalne koncentracije ADP-a, praćen je i smanjenjem procenta agregata monocita i trombocita u istim eksperimentalnim uslovima. Konzumacija soka nije delovala na procenat agregacije trombocita sa neutrofilima.

Sok od nara bogat je antocijanima, ali ujedno predstavlja i najbolji dijetarni izvor elagitanina u odnosu na ostale voćne sokove (202). Na osnovu literaturnih podataka efekti konzumacije soka od nara na funkciju trombocita ispitivani su samo u okviru dugotrajnih intervencija. Aviram i saradnici pokazali su da konzumacija 50 ml soka od nara tokom dve nedelje, dovodi do smanjenja agregacije trombocita indukovane kolagenom kod zdravih ispitanika, pri čemu nije bilo uticaja na nivo lipida u serumu (95, 203). Elagitanini kao biokativni sastojci armanjak konjaka pokazali su značajan efekat na ADP-om indukovanu agregaciju trombocita nakon dve nedelje intervencije, ali i 2 nedelje nakon završetka intervencije. Istovremeno, efekta na kolegenom indukovanu agregaciju nije bilo, dok se trombinom-indukovana agregacija značajno smanjila nakon 2 nedelje intervencije i nedelju dana posle završetka intervencije (204). Kako je ranije predloženo (84), s obzirom na kratko vreme poluživota polifenola i njihovih metabolita (70) efekti dugoročne konzumacije mogu se objasniti kumulativnim direktnim efektima na trombocite ili indirektnim delovanjem na faktore rizika koji imaju negativan uticaj na funkciju trombocita. U tom smislu hroničan efekat soka od nara može biti posredovan pokazanim povoljnim efektima na nivo oksidovanog LDL-a (203) i povoljnim delovanjem na insulinsku rezistenciju (205), kao faktorima koji utiču na funkciju trombocita (206, 207).

Akutno delovanje na trombocite takođe može biti direktno ili indirektno. Predloženi mehanizmi direktnog delovanja bioaktivnih komponenata nara na funkciju trombocita, pokazani pri tretmanu trombocita sokom ili ekstraktom nara u *in vitro* uslovima, uključuju inhibiciju mobilizacije kalcijuma, produkcije tromboksana A<sub>2</sub> i formiranja vodonik peroksida kao odgovora na delovanje agonista, koji su bili praćeni inhibicijom agregacije trombocita (177). Potencijalno objašnjenje pokazanog akutnog efekta konzumacije soka od nara na ekspresiju P-selektina u našoj studiji, podrazumeva

i delovanje posredovano endotelom. Hashemi i saradnici pokazali su da 4 h nakon konzumacije 240 ml soka od nara dolazi do značajnog smanjenja protokom i nitroglicerinom posredovane vazodilatacije (208), koja je zavisna od azot-monoksida (209). Azot-monoksid inhibira ekspresiju P-selektina i smatra se odgovornim za pokazano inhibitorno delovanje endotelnih ćelija na aktivaciju trombocita indukovanu ADP-om (210). Pored azot-monoksida delovanje soka od nara na aktivaciju trombocita može biti i posledica delovanja prostaciklina poreklom iz vaskularnog endotela. Pokazano je da akutna konzumacija soka od nara dovodi do produženja vremena koagulacije indukovanog sinergističkim delovanjem kolagena i epinefrina *ex vivo* kod zdravih dobrovoljaca. Uporedo sa *ex vivo* delovanjem delimično usmerenim i na funkciju trombocita, u *in vitro* uslovima kratkotrajni tretman endotelnih ćelija poreklom iz aorte ispitivanim sokom doveo je do povećanja koncentracije prostaciklina u hranljivom medijumu i povećane sinteze prostaciklina u ispitivanim ćelijama nakon dugotrajnog tretmana. Isti efekti pokazani su i za sok od crnog grožđa, koji su za razliku od efekata soka od nara, bili praćeni i povećanjem nivoa 6-keto-prostaglandin F1 $\alpha$ , stabilnog metabolita prostaciklina, u plazmi zdravih ispitanika 2h nakon konzumacije (211).

Pored povećane aktivacije trombocita, odnosno povećanog procenta trombocita u bazalnom statusu koji na površini ekspimiraju markere aktivacije, osobe sa prisutnim faktorima rizika za nastanak KVB karakteriše i hiper-reaktivni status trombocita, definisan na osnovu odgovora na niske koncentracije agonista na koje trombociti osoba bez prisutnih faktora rizika nisu osetljivi (212). Pokazano je da hiper-reaktivnost trombocita prema niskim koncentracijama ADP-a kao agonista koreliše sa incidencom infarkta i šloga kod osoba sa faktorima rizika ili manifestovanim simptomima KVB (32). U skladu sa tim, delovanje soka od nara usmereno upravo na parametre funkcije trombocita, za koje je pokazano da se razlikuju kod zdravih i osoba sa prisutnim faktorima rizika, ukazuju na potencijal ovog soka ne samo u primarnoj, već i u sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih bolesti.

S ciljem evaluacije potencijalnih mehanizama delovanja biljnih polifenola na aktivaciju trombocita i njihovu interakciju sa krvnim ćelijama, u okviru doktorske disertacije ispitivano je i delovanje ekstrakata biljaka koje sadrže polifenole na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u krvnim ćelijama izloženim delovanju prooksidanasa.

Ispitivanje antioksidativnog delovanja biljnih ekstrakata i bioaktivnih jedinjenja u ćelijskim modelima najčešće ima za cilj procenu njihove bioraspoloživosti i delovanja

u biološkim sistemima (158), zavisi od strukture ispitivanih jedinjenja i veoma često nije u saglasnosti sa antioksidativnom aktivnošću određenom hemijskim metodama (213).

Kao ćelijski modeli za ispitivanje antioksidativne aktivnosti najčešće se koriste maligne ili transformisane normalne ćelije humanog porekla, gajene u kulturi. Prednost korišćenja ćelijskih linija je isti fenotip ćelija i shodno tome visoka reproduktivnost dobijenih rezultata. Istovremeno, fenotip maligne ćelije karakteriše i izmenjen redoks status u odnosu na normalne ćelije i shodno tome ove ćelije ne predstavljaju adekvatan model u ispitivanju antioksidativne zaštite delovanjem sastojaka namirnica, kao mehanizma preventivnog delovanja (214). Na ćelijskom modelu efekte antioksidanasa moguće je pratiti uticajem na vijabilnost ćelija nakon delovanja prooksidanasa ili uticajem na funkcionalnost ćelije. Kao parametri funkcije ćelija, od značaja za antioksidativno delovanje, najčešće se evaluiraju: redoks status - praćenjem produkcije reaktivnih vrsta kiseonika, nivoa glutaciona ili aktivnosti antioksidativnih enzima; intracelularna oksidacija – inkorporacijom fluorescentnih ili fluorogenih proba; ili oksidativno oštećenje membrana – određivanjem nivoa malonil-dialdehida. U našoj studiji, kao ćelijski model za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, nara, kelja i japanske jabuke korišćeni su humani eritrociti izolovani iz periferne krvi, a efekti su praćeni na osnovu intraćelijske oksidacije inkorporirane fluorogene probe, dihloro-fluorescein-diacetata, nakon izlaganja ćelija delovanju vodonik peroksida. Pokazano je da ispitivani ekstrakti pored pokazane antiradikalske aktivnosti određene hemijskom metodom, ispoljavaju antioksidativno delovanje i na eritrocite kao ćelijskom modelu. S obzirom na prirodu testa, ovo delovanje potencijalno uključuje direktno antioksidativno delovanje biološki aktivnih sastojaka ekstrakata, ali i delovanje na enzime antioksidativne zaštite prisutne u eritrocitima. S obzirom da nemaju mitohondrije, uticaj na ove krvne ćelije ne uključuje delovanje posredovano signalnim događajima unutar mitohondrija (158).

Ekstrakt šarplaninskog čaja, čije je biološko delovanje ispitivano u okviru ove disertacije, pokazao je antioksidativno delovanje i u ćelijskom modelu HepG2 ćelija, porekla iz malignog karcinoma jetre, povećavajući ukupni antioksidativni kapacitet ćelija i nivo glutaciona u bazalnim uslovima i nakon izlaganja ćelija delovanju prooksidansa i smanjujući delimično nivo malonil-aldehida formiranog usled delovanja prooksidansa, u odnosu na kontrolne ćelije tretirane samo terc-butil hidroperoksidom kao prooksidansom. Pokazani efekti šarplaninskog čaja bili su poredivi sa delovanjem

ekstrakta zelenog čaja (215). Ispitivanjem delovanja soka od celog nara, soka arilusa nara i ekstrakta kore nara na citotoksično delovanje prooksidanasa na HUVEC ćelije i monocite u kulturi, pokazan je efekat jedino ekstrakta kore nara, koji je pripisan najvećem sadržaju elaginske kiseline i punikalagina (216). O antioksidativnom delovanju ekstrakata koprive, mirođije, kelja, japanske jabuke u biološkim sistemima nema dostupnih podataka u literaturi.

Uporedo sa ispitivanjem ekstrakata tradicionalnih biljaka, u istim eksperimentalnim uslovima na eritrocitima kao ćelijskom modelu, ispitivano je i antioksidativno delovanje vodene i metanolne frakcije etanolno-vodenog ekstrakta ploda aronije. Dobijene razlike u antioksidativnoj zaštiti dve ispitivane frakcije, mogu se objasniti većim sadržajem antocijana u frakciji F1 koja nije uticala na antiradikalnu sposobnost frakcija. U skladu sa predloženim su i rezultati Slatnar-a i saradnika koji su ispitivali antioksidativno delovanje različitih sokova od jagodastog voća, u *in vitro* uslovima na ćelijama *Saccharomyces cerevisiae*, bojenjem ćelija DHFDA ali bez izlaganja prooksidansima. Dobijeni rezultati nisu korelisali sa antiradikalnim kapacitetom određenim DPPH testom i autori su zaključili da su osnovni faktori koji utiču na antioksidativni kapacitet u ćelijskom sistemu bioraspoloživost polifenola ali i odnos pojedinih klasa polifenola prisutnih u soku. Najpovoljnije delovanje imali su sokovi sa visokim sadržajem antocijana a niskim sadržajem hidroksi-cimetne kiseline. Antioksidativni kapacitet je bio obrnuto proporcionalan raspoloživosti unutar ćelija, ukazujući na tzv „hormetički efekat“ polifenola u pogledu antioksidativnog delovanja (217).

Protokatehnična kiselina (3,4-dihidroksi benzojeva kiselina) predstavlja jedan od najznačajnijih humanih metabolita cijanidin-glukozida, antocijanina prisutnog u plodu aronije (189, 218). Antioksidativno delovanja ove kiseline, uočeno samo pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji na ćelijskom modelu u okviru naše studije, ukazuje da direktno delovanje, najverovatnije ne predstavlja osnovni mehanizam antioksidativnog delovanja, već da ono uključuje i „hormetički efekat“ kao posledicu delovanja na nivou endogenih antioksidanasa. Dobijeni rezultati i predloženi zaključci u skladu su sa literaturnim podacima. Na animalnim modelima tumora kože pokazano je da niže koncentracije protokatehnične kiseline imaju povoljno delovanje, dok se sa povećanjem koncentracije i produženjem vremena izloženosti ispoljava njen prooksidativni efekat (219). Pokazano je, takođe, da protokatehnična kiselina pri koncentraciji od 10 mM indukuje oksidativni stres u transformisanim i malignim ćelijama porekla iz oralnog

tkiva, dok pri koncentraciji od 2.5 mM ne pokazuje toksične efekte, ali povećava osetljivost ćelija na delovanje prooksidanasa (220). Tretman protokatehuidnom kiselinom u koncentracijama od 50-200  $\mu$ M, pre delovanja  $H_2O_2$ , povećavao je preživljavanje u odnosu na kontrolu i redukovao citotoksično delovanje  $H_2O_2$  na PC12 ćelije feohromcitoma pacova. U istoj studiji pokazano je da dijetarna intervencija biljnim izvorom protokatehuidne kiseline dovodi do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima u homogenatu moždanog tkiva pacova (221). Protokatehuidna kiselina pri niskim koncentracijama ispoljava stimulatorno delovanje na aktivnost antioksidativnih enzima i u kuturi makrofaga J774 A.1 (222).

Reaktivne vrste kiseonika i azota imaju značajnu ulogu u funkciji trombocita. Izlaganje trombocita delovanju vodonik-peroksida, peroksinitrita ili enzimskih sistema koji generišu superoksidni radikal dovodi do povećanja osetljivosti trombocita na agonističko delovanje ADP-a, trombina, kolagena i epinefrina, a može dovesti i do spontane aktivacije (223). Pored egzogenih oksidanasa, na funkciju trombocita utiču i reaktivne vrste kiseonika, poreklom iz samih trombocita. Izlaganje trombocita delovanju ADP-a, kolagena ili trombina dovodi do generisanja vodonik peroksida, superoksidnog radikala ili hidroksilnog radikala u trombocitima (224), što ukazuje na potencijalnu autokrinu ili parakrinu ulogu navedenih reaktivnih molekulskih vrsta u njihovoj aktivaciji. Pojedini aktivacioni i adhezioni receptori trombocita sadrže tiolne grupe, kao delove molekula osetljive na promenu redoks statusa u ćeliji ili neposrednom okruženju, podložne modifikaciji delovanjem redukovanog ili oksidovanog glutationa, homocisteina ili azot-monoksida (225), čime se delimično objašnjava hiper-reaktivnost trombocita u patološkim stanjima koje karakteriše poremećaj statusa nabrojanih činilaca. Na osnovu navedenih podataka jedan od predloženih mehanizama inhibitornog delovanja na aktivaciju trombocita predstavlja i delovanje različitih agenasa na redoks status ovih ćelija (225).

U okviru ove disertacije pokazano je da izlaganje trombocita zdravih osoba delovanju ispitivanih ekstrakata, koje je prethodilo delovanju ADP-a kao agonista, dovodi do smanjenja nivoa reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima. Kao i u slučaju ispitivanja antioksidativnog delovanja ekstrakata na eritrocite kao ćelijskog modela, pokazani efekti mogu biti posledica direktnog antioksidativnog delovanja prisutnih fitohemikalija i/ili posledica uticaja na komponente antioksidativne zaštite ćelije. Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, kelja, nara i japanske jabuke na nivo reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima, kao odgovora na delovanje agonista, kao i na parametre

oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u trombocitima, pokazan za ekstrakte drugih biljaka bogatih polifenolima, nije ranije ispitan.

U *in vitro* eksperimentalnim uslovima pokazano je da ekstrakt aronije dovodi do povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima i nivoa redukovano glutaciona u trombocitima zdravih ispitanika izloženih delovanju vodonik peroksida (226), kao i do smanjene produkcije superoksidnog anjona, smanjenja nivoa karbonilnih grupa i 3-nitrotirozina u proteinima i povećanja nivoa glutaciona u trombocitima zdravih ispitanika i ispitanika sa malignim bolestima (179, 180). Efekat ekstrakta aronije na smanjenje nivoa 8-epi-prostaglandina F<sub>2</sub> kao markera lipidne peroksidacije i povećanje nivoa redukovano glutaciona u trombocitima zdravih osoba izloženih delovanju vodonik peroksida bio je praćen inhibicijom ekspresije GPIIb-IIIa na trombocitima (178).

Ryszawa i saradnici ispitivali su uticaj ekstrakta aronije na produkciju superoksidnog anjona u trombocitima zdravih ispitanika i ispitanika sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, kao i agregaciju trombocita indukovanu kolagenom i trombinom. Produkcija superoksidnog anjona bio je statistički značajnije viša u grupi ispitanika sa faktorima rizika i tretman ekstraktom aronije doveo je do smanjenja produkcije ovog anjona samo u toj grupi ispitanika do vrednosti koje su odgovarale zdravim ispitanicima. Agregacija trombocita stimulisanim trombinom i kolagenom nije se razlikovala između grupa i ekstrakt aronije dozno zavisno je smanjivao agregaciju kod obe grupe ispitanika nezavisno od agonista (181). Na osnovu razlika u efektima između grupa, autori su zaključili da su pokazani efekti nezavisni jedan od drugog. Olas i saradnici pokazali su da ekstrakt aronije dozno-zavisno smanjuje produkciju superoksidnog anjona u bazalnim uslovima, kao i produkciju ovog radikala indukovanu trombinom. Pokazani efekti bili su praćeni inhibicijom agregacije trombocita indukovane trombinom i inhibicije adhezije trombinom aktiviranih trombocita za kolagen (182). I drugi dijetarni antioksidansi ispoljavaju povoljno delovanje na funkciju trombocita (227).

Pored delovanja na trombocite polifenoli i njihovi metaboliti ispoljavaju antioksidativno delovanje i na druge ćelije izložene delovanju agonista. Antioksidativno delovanje urolitina, metabolita elagitanina nara nastalih delovanjem mikroorganizama crevne flore, na HL-60 ćelije mijelomonocitne leukemije izložene delovanju forbol-miristat-acetata kao agonista, pokazano je primenom DCF-DA kao fluorescentne probe (228).

Uporedo sa ispitivanjem delovanja ekstrakata biljaka koje sadrže polifenole i namirnica, koje predstavljaju dijetarni izvor ovih biološki aktivnih nenutritivnih komponenata, na aktivaciju trombocita i njihovu interakciju sa krvnim ćelijama, u okviru ove doktorske disertacije ispitivan je i njihov uticaj na interkaciju trombocita sa ćelijama endotela i malignim ćelijama.

Prikazani rezultati pokazuju da konzumacija soka od aronije dovodi do značajnog smanjenja adhezije trombocita ispitanika sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti za EA.hy 929 ćelije, porekla iz vaskularnog endotela. Kako adhezija trombocita za endotelne ćelije zavisi od ekspresije i P-selektina i GPIIb-IIIa na površini trombocita (229), dobijeni rezultati u skladu su sa značajnim uticajem konzumacije soka od aronije na ekspresiju ovih aktivacionih markera trombocita, prikazanim u okviru ove disertacije. Uticaj soka od aronije na adheziju trombocita za endotelne ćelije nije ranije ispitivan.

Endotel krvnih sudova ima inhibitorno delovanje na aktivaciju i agregaciju trombocita koje je posredovano delovanjem relaksantnih faktora poreklom iz endotela (eng. *endothelium-derived relaxing factor* – EDRF), azot-monoksida i prostaciklina (230). Istovremeno, endotel je izvor i vazokonstriktornih i prokoagulatornih molekula: vWF, endotelina-1 i faktora aktivacije trombocita. Smanjena produkcija vazodilatatornih i antiagregacionih faktora, a povećana produkcija i vazokonstriktornih i prokoagulatornih molekula pokazana je u pojedinim patološkim stanjima koja uključuju hipertenziju, dijabetes, hiper-holesterolemiju i prisustvo aterosklerotskih promena na krvnim sudovima. Delovanje polifenola na poremećenu funkciju endotelne ćelije potvrđeno je u brojnim istraživanjima (81) U *in vitro* eksperimentalnim uslovima Luzak i saradnici pokazali su da ekstrakt aronije, kao značajan izvor polifenola, stimuliše inhibitorno delovanje endotela na ekspresiju P-selektina trombocita indukovanu delovanjem adenozin-difosfata (183).

Prikazani rezultati ukazuju da polifenoli ispoljavaju delovanje na interakciju endotelne ćelije i trombocita i uticajem na funkciju trombocita. Pretpostavljeni mehanizmi uključuju inhibiciju P-selektina i GPIIb-IIIa, praćenu povećanim oslobađanjem azot-monoksida i sniženjem nivoa superoksida u trombocitima i neposrednoj okolini (231), kao i smanjenim oslobađanjem drugih trombocitnih činilaca uključenih u proces adhezije trombocita za endotel (232). Predloženi esej predstavlja jedan od modela za ispitivanje uticaja sastojaka namirnica, kao i uticaja konzumacije

namirnica na funkciju trombocita i time posredovanu interakciju trombocita sa endotelom, kao procesa uključenog u nastanak i razvoj ateroskleroze i tromboze (233).

Inhibicija agregacije trombocita i malignih ćelija predstavlja jedan od predloženih mehanizama antitumorskog delovanja različitih agenasa, s obzirom na ulogu ovog procesa u efikasnosti imunskog odgovora organizma na malignu proliferaciju, metastatskom potencijalu tumorskih ćelija i angiogenezi (6).

U sklopu preliminarnih ispitivanja ispitivali smo antiproliferativno delovanje sokova od jagodastog i bobičastog voća, sokova od aronije i nara i ispitivanih ekstrakata na panelu malignih ćelija, kao najčešće ispitivanog mehanizma antitumorskog delovanja biljnih ekstrakata.

Rezultati antiproliferativnog delovanja ispitivanih sokova bili su u saglasnosti sa podacima iz literature u pogledu različite osetljivosti malignih ćelija zavisno od porekla, pri čemu je pokazano da su maligne ćelije porekla epitelnih ćelija kolona manje osetljive u odnosu na HeLa ćelije (234), kao i u pogledu zavisnosti antiproliferativnog delovanja od prisustva pojedinih klasa polifenola, pre nego od ukupnog sadržaja polifenola (234). Dodatno, podaci iz literature ukazuju i na značaj sinergističkog delovanje svih fitohemikalija prisutnih u sokovima (235).

Odsustvo antiproliferativnog delovanja ekstrakta šarplaninskog čaja u skladu je sa rezultatima Danesi i saradnika koji su pokazali da inkubacija HepG2 ćelija malignog karcinoma jetre sa ekstraktom šarplaninskog čaja ne utiče na proliferaciju ćelija određenu MTT testom i ne dovodi do citotoksičnog delovanja, odnosno povećanja nivoa laktat-dehidrogenaze u medijumu (215). Odsustvo antiproliferativnog delovanja ekstrakata koprive u predloženom modelu u skladu su sa literaturnim podacima (236). Na osnovu pregleda dostupne literature antiproliferativno delovanje ekstrakata mirođije i japanske jabuke nije ispitivano ranije.

Uticaj ekstrakata koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara i japanske jabuke na agregaciju trombocita sa malignim ćelijama nije ranije ispitivan. Analizom dobijenih podataka uočeno je da ispitivani ekstrakti ne utiču na broj malignih ćelija za koje su vezani trombociti, ali je pokazan potencijal ispitivanih ekstrakata da delovanjem na trombocite dovode do redukcije broja trombocita koji se vezuje za maligne ćelije.

Iako malobrojna, prethodna istraživanja pokazala su da ekstrakti biljaka imaju potencijal da utiču na interakciju trombocita i malignih ćelija. Yazdanparast i Mianabadi pokazali su da pre-tretman trombocita ekstraktom biljke *Dendrostellera lessertii*, dovodi do 90% inhibicije adhezije trombocita za HL-60 ćelije u kulturi u prisustvu trombina



(237). Studije na animalnim modelima pokazale su antiangiogenetsko i antimetastatsko delovanje biljnih polifenola (238, 239). Pokazano je takođe da je inhibitorno delovanje pojedinih farmakoloških agenasa na aktivnost matriksnih metaloproteinaza i aktivaciju trombocita delovanjem ADP-a praćeno inhibicijom interakcije trombocita sa malignim ćelijama (240).

S obzirom na značaj trombocita u patogenezi malignih bolesti, koji se jednim delom ispoljava i sekvestracijom malignih ćelija trombocitima i smanjenom efikasnošću imunskog nadzora (6), pokazani rezultati inhibicije vezivanja trombocita tretiranih ispitivanim ekstraktima za maligne ćelije ukazuje na jedan od potencijalnih mehanizama njihovog antitumorskog delovanja. Za potvrdu ovakvog delovanja neophodna su detaljnija istraživanja.

Rezultati prikazani u okviru ove doktorske disertacije pokazali su povoljne efekte ispitivanih biljaka koje sadrže polifenole i namirnica biljnog porekla koje predstavljaju dijetarni izvor polifenola na pojedine parametre aktivacije trombocita i njihove agregacije sa monocitima i neutrofilima. U skladu sa postavljenim ciljevima studije, na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti sledeće:

1. Svi ispitivani suvi ekstrakti: ekstrakt koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke i aronije, delovali su na neki od parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa monocitima i neutrofilima, kod zdravih ispitanika ili ispitanika sa metaboličkim sindromom. Na najveći broj parametara delovali su ekstrakti kelja i mirođije, a u tom smislu najmanje izraženo delovanje pokazao je ekstrakt nara.

2. Svi ispitivani metaboliti: kvercetin-3-glukuronid, 3'-metil-kvercetin-3-glukuronid, kvercetin-3'-sulfat i sulforafan-cistein-glicin, delovali su na neki od parametara aktivacije trombocita i njihove agregacije sa monocitima i neutrofilima, kod zdravih ispitanika ili ispitanika sa metaboličkim sindromom. Sulforafan-cistein-glicin delovao je na veći broj parametara u odnosu na metabolite kvercetina. Delovanje 3'-metil-kvercetin-3-glukuronida bilo je izraženije u odnosu na delovanje ostalih metabolita kvercetina

3. Jednokratna konzumacija soka od aronije kod zdravih ispitanika dovodi do smanjenja aktivacije trombocita i njihove agregacije sa monocitima i neutrofilima koje je pokazano smanjenjem:

- procenta P-selektin-pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja adenzin-difosfata i arahidonske kiseline kao agonista;
- gustine P-selektina nakon *ex vivo* delovanja adenzin-difosfata i arahidonske kiseline kao agonista;
- procenta agregata trombocita i monocita u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja adenzin-difosfata i arahidonske kiseline kao agonista;
- procenta agregata trombocita sa neutrofila u bazalnim uslovima i nakon *ex vivo* delovanja adenzin-difosfata i arahidonske kiseline kao agonista.

4. Jednokratna konzumacija čaja od koprive, čaja od mirođije i šarplaninskog čaja kod ispitanika sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti dovodi do smanjenja pojedinih parametara aktivacije trombocita:

Konzumacija čaja od mirođije dovodi do smanjenja:

- procenta P-selektin-pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima, kao i nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata kao agonista;
- gustine P-selektina nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata kao agonista;
- procenta GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata kao agonista.

Konzumacija čaja od koprive dovodi do smanjenja:

- procenta P-selektin-pozitivnih trombocita nakon *ex vivo* delovanja optimalne koncentracije adenzin-difosfata kao agonista;
- gustine P-selektina u bazalnim uslovima;
- procenta GPIIb-IIIa-pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima.

Konzumacija šarplaninskog čaja dovodi do smanjenja:

- P-selektin-pozitivnih trombocita nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata i kao i nakon *ex vivo* delovanja arahidonske kiseline;
- gustine P-selektina u bazalnim uslovima;
- procenta GPIIb-IIIa pozitivnih trombocita u bazalnim uslovima.

Poređenjem delovanja jednokratne konzumacije čajeva od koprive, mirođije i šarplaninskog čaja, može se zaključiti da je konzumacija čaja od mirođije dovela je do promene najvećeg broja parametara aktivacije trombocita kod ispitanika sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti. Nijedan od ispitivanih čajeva nije uticao na procenat agregata trombocita sa monocitima i neutrofilima

5. Jednokratna konzumacija soka od nara kod ispitanika sa faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti dovodi do smanjenja aktivacije trombocita i njihove agregacije sa monocitima koje je pokazano smanjenjem:

- procenta P-selektin-pozitivnih trombocita nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata kao agonista;
- gustine P-selektina nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne i optimalne koncentracije adenzin-difosfata kao agonista;
- procenta agregata monocita i trombocita nakon *ex vivo* delovanja suboptimalne adenzin-difosfata kao agonista.

Nije pokazano delovanje konzumacije soka od nara na:

- ekspresiju GPIIb-IIIa na trombocitima;
- procenat agregata trombocita i neutrofila.

6. Na osnovu rezultata ispitivanja potencijalnih mehanizama delovanja biljnih polifenola na aktivaciju trombocita, kao i ispitivanja uticaja polifenola na interakciju sa ćelijama endotela i malignim ćelijama, došlo se do sledećih zaključaka:

- ekstrakti koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke smanjuju nivo reaktivnih vrsta kiseonika u eritrocitima izloženim delovanju vodonik peroksida;
- ekstrakti koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke smanjuju nivo reaktivnih vrsta kiseonika u trombocitima izloženim delovanju adenzin-difosfata;
- konzumacija soka od aronije dovodi do smanjenja adhezije trombocita za EA.hy 926 ćelije vaskularnog endotela;
- ekstrakti koprive, mirođije, šarplaninskog čaja, kelja, nara, japanske jabuke dovode do smanjenja agregacije trombocita sa HeLa ćelijama malignog karcinoma grlića materice.

S obzirom da najveći stepen naučne zasnovanosti biološkog delovanja polifenola pružaju rezultati interventnih studija, pokazano delovanje soka od aronije ukazuje na značajnu ulogu ove namirnice kao sastavnog dela optimalne dijeta i njen potencijalni značaj u očuvanju kardiovaskularnog zdravlja i prevenciji nepovoljnog uticaja faktora sredine na trombocite, uključujući i uticaj neodgovarajuće dijeta i nepravilnog režima ishrane.

Iako slabije izraženo u odnosu na efekte soka od aronije, delovanje ispitivanih čajeva, čijom se jednokratnom konzumacijom obezbeđuje značajnije manji unos polifenola u odnos na ispitivane sokove, pruža osnovu za dalja ispitivanja efekta dugotrajne konzumacije na funkciju trombocita, kao i ispitivanja uticaja na fiziološku postprandijalnu aktivaciju trombocita.

Delovanje soka od nara, pokazano kod ispitanika sa prisutnim faktorima rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti, usmereno je na parametre funkcije trombocita za koje je pokazano da se razlikuju kod zdravih i osoba sa prisutnim faktorima rizika i shodno tome ukazuje na potencijal ovog soka ne samo u primarnoj, već i u sekundarnoj prevenciji ovih bolesti.

## LITERATURA

1. Michelson AD. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
2. Frojmovic MM, Milton JG. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol Rev.* 1982;62(1):185-261.
3. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs.* 2002;1(4):273-88.
4. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8(11):1227-34.
5. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(1):18-22.
6. Nierodzik MN, Karpatkin S. Tumor growth and metastasis. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier;; 2007.
7. Bergmeier W, Wagner DD. Inflammation. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier;; 2007.
8. Elzey BD, Sprague DL, Ratliff TL. The emerging role of platelets in adaptive immunity. *Cell Immunol.* 2005;238(1):1-9.
9. Li Q-X, Masters CL. Alzheimer's disease. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
10. Gurguis GNM. Psychiatric disorders. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
11. Hartley PS. Platelet senescence and death. *Clin Lab.* 2007;53(3-4):157-66.
12. White JG. Platelet structure. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
13. Reed GL. Platelet secretion In: Michelson AD, editor. Platelets. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
14. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptors. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
15. Kroll M, Hellums J, McIntire L, Schafer A, Moake J. Platelets and shear stress. *Blood.* 1996;88(5):1525-41.
16. Andrews RK, Berndt MC, López JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
17. Plow EF, Pesho MM, Ma Y-Q. Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.
18. Andre P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol.* 2004;126(3):298-306.
19. McEver RP. P-Selectin/PSGL-1 and other interactions between platelets, leukocytes, and endothelium. In: Michelson AD, editor. Platelets. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier; 2007.

20. Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, et al. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*. 1998;92(2):507-15.
21. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med*. 2003;9(1):61-7.
22. Totani L, Evangelista V. Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2357-61.
23. Koenen RR, Weber C. Platelet-derived chemokines in vascular remodeling and atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost*. 2010;36(2):163-9.
24. André P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: The switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106(8):896-9.
25. Balagopal PB, de Ferranti SD, Cook S, Daniels SR, Gidding SS, Hayman LL, et al. Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;123(23):2749-69.
26. Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control Geneva: World Health Organization (in collaboration with the World Heart Federation and World Stroke Organization); 2011.
27. Broijersen A, Hamsten A, Eriksson M, Angelin B, Hjendahl P. Platelet activity in vivo in hyperlipoproteinemia--importance of combined hyperlipidemia. *Thromb Haemost*. 1998;79(2):268-75.
28. Nityanand S, Pande I, Bajpai VK, Singh L, Chandra M, Singh BN. Platelets in essential hypertension. *Thromb Res*. 1993;72(5):447-54.
29. Neubauer H, Setiadi P, Pinto A, Gunesdogan B, Meves SH, Borgel J, et al. Upregulation of platelet CD40, CD40 ligand (CD40L) and P-Selectin expression in cigarette smokers: a flow cytometry study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009;20(8):694-8.
30. Ouvina SM, La Greca RD, Zanaro NL, Palmer L, Sassetti B. Endothelial dysfunction, nitric oxide and platelet activation in hypertensive and diabetic type II patients. *Thromb Res*. 2001;102(2):107-14.
31. Vaduganathan M, Alviar CL, Arikan ME, Tellez A, Guthikonda S, DeLao T, et al. Platelet reactivity and response to aspirin in subjects with the metabolic syndrome. *Am Heart J*. 2008;156(5):1002 e1- e7.
32. Angiolillo DJ, Bernardo E, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Costa MA, Palazuelos J, et al. Impact of platelet reactivity on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(16):1541-7.
33. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol*. 2002;3(7):425-30.
34. Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW, Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res*. 1993;53(6):1322-7.

35. Jiang MC, Liao CF, Lee PH. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;282(3):671-7.
36. Negrao R, Duarte D, Costa R, Soares R. Could platelet-accumulating polyphenols prevent tumour metastasis? *Nat Rev Cancer.* 2011;11(9):685.
37. Fung TT, Rimm EB, Spiegelman D, Rifai N, Tofler GH, Willett WC, et al. Association between dietary patterns and plasma biomarkers of obesity and cardiovascular disease risk. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(1):61-7.
38. Kerver JM, Yang EJ, Bianchi L, Song WO. Dietary patterns associated with risk factors for cardiovascular disease in healthy US adults. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(6):1103-10.
39. Sudic D, Razmara M, Forslund M, Ji Q, Hjemdahl P, Li N. High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms. *Brit J Haematol.* 2006;133(3):315-22.
40. Aviram M, Gerald Brook J. Platelet activation by plasma lipoproteins. *Prog Cardiovasc Dis.* 1987;30(1):61-72.
41. Canavan B, Salem RO, Schurgin S, Koutkia P, Lipinska I, Laposata M, et al. Effects of physiological leptin administration on markers of inflammation, platelet activation, and platelet aggregation during caloric deprivation. *J Clin Endocr Metab.* 2005;90(10):5779-85.
42. Trovati M, Anfossi G, Cavalot F, Massucco P, Mularoni E, Emanuelli G. Insulin directly reduces platelet sensitivity to aggregating agents: Studies in vitro and in vivo. *Diabetes.* 1988;37(6):780-6.
43. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Brit J Pharmacol.* 1987;92(3):639-46.
44. Broijerssen A, Karpe F, Hamsten A, Goodall AH, Hjemdahl P. Alimentary lipemia enhances the membrane expression of platelet P-selectin without affecting other markers of platelet activation. *Atherosclerosis.* 1998;137(1):107-13.
45. Hyson DA, Paglieroni TG, Wun T, Rutledge JC. Postprandial lipemia is associated with platelet and monocyte activation and increased monocyte cytokine expression in normolipemic men. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2002;8(2):147-55.
46. Gresele P, Guglielmini G, De Angelis M, Ciferri S, Ciofetta M, Falcinelli E, et al. Acute, short-term hyperglycemia enhances shear stress-induced platelet activation in patients with type II diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(6):1013-20.
47. Gresele P, Marzotti S, Guglielmini G, Momi S, Giannini S, Minuz P, et al. Hyperglycemia-induced platelet activation in type 2 diabetes is resistant to aspirin but not to a nitric oxide-donating agent. *Diabetes Care.* 2010;33(6):1262-8.
48. Petrović M, Dopsaj V, Rajić M, Milojević Z. *Laboratorijska hematologija.* Beograd: Farmaceutski fakultet; 2002.
49. Vizioli L, Muscari S, Muscari A. The relationship of mean platelet volume with the risk and prognosis of cardiovascular diseases. *Int J Clin Pract.* 2009;63(10):1509-15.



50. Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL, Eikelboom JW, Konkle B, et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2010;8(1):148-56.
51. Harrison P. Platelet function analysis. *Blood Rev.* 2005;19(2):111-23.
52. Nunez R. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Curr Issues Mol Biol.* 2001;3(2):39-45.
53. Hagberg IA, Lyberg T. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets.* 2000;11(3):137-50.
54. Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Hematology.* 2005;10 Suppl 1:132-7.
55. Horstman LL, Ahn YS. Platelet microparticles: a wide-angle perspective. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999;30(2):111-42.
56. Chakrabarti S, Vitseva O, Iyu D, Varghese S, Freedman JE. The effect of dipyridamole on vascular cell-derived reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(2):494-500.
57. Krueger LA, Barnard MR, Frelinger AL, 3rd, Furman MI, Michelson AD. Immunophenotypic analysis of platelets. *Curr Protoc Cytom.* 2002;Chapter 6:Unit 6 10.
58. Barnard MR, Krueger LA, Frelinger AL, 3rd, Furman MI, Michelson AD. Whole blood analysis of leukocyte-platelet aggregates. *Curr Protoc Cytom.* 2003;Chapter 6:Unit 6 15.
59. Matzdorff A. Platelet function tests and flow cytometry to monitor antiplatelet therapy. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(4):393-9.
60. Smith JP, Haddad EV, Taylor MB, Oram D, Blakemore D, Chen Q, et al. Suboptimal inhibition of platelet cyclooxygenase-1 by aspirin in metabolic syndrome. *Hypertension.* 2012;59(3):719-25.
61. Block RC, Harris WS, Reid KJ, Spertus JA. Omega-6 and trans fatty acids in blood cell membranes: a risk factor for acute coronary syndromes? *Am Heart J.* 2008;156(6):1117-23.
62. Bredie SJ, Wollersheim H, Verheugt FW, Thien T. Low-dose aspirin for primary prevention of cardiovascular disease. *Semin Vasc Med.* 2003;3(2):177-84.
63. Campbell CL, Smyth S, Montalescot G, Steinhubl SR. Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *JAMA.* 2007;297(18):2018-24.
64. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, Vermylen J, Cerletti C, de Gaetano G. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. A systematic review. *Thromb Haemost.* 2008;99(1):14-26.
65. Pamukcu B. A review of aspirin resistance; definition, possible mechanisms, detection with platelet function tests, and its clinical outcomes. *J Thromb Thrombolysis.* 2007;23(3):213-22.
66. Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J.* 2007;153(2):175-81.

- 
67. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976;24:117-91.
68. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.
69. Zujko ME, Witkowska AM, Waskiewicz A, Sygnowska E. Estimation of dietary intake and patterns of polyphenol consumption in Polish adult population. *Adv Med Sci.* 2012;1-10.
70. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):230S-42S.
71. van Duynhoven JPM, van Velzen EJJ, Westerhuis JA, Foltz M, Jacobs DM, Smilde AK. Nutrikinetics: Concept, technologies, applications, perspectives. *Trends Food Sci Tech.* 2012;26(1):4-13.
72. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):243S-55S.
73. Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(6):276-82.
74. Neveu V, Perez-Jimenez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, et al. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford).* 2010;2010:bap024.
75. Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, et al. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? *Am J Clin Nutr.* 2004;80(1):15-21.
76. Hertog MI KDAC, et al. FLavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.* 1995;155(4):381-6.
77. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1):317S-25S.
78. Mennen LI, Sapinho D, de Bree A, Arnault N, Bertrais S, Galan P, et al. Consumption of foods rich in flavonoids is related to a decreased cardiovascular risk in apparently healthy French women. *J Nutr.* 2004;134(4):923-6.
79. Kuriyama S. The relation between green tea consumption and cardiovascular disease as evidenced by epidemiological studies. *J Nutr.* 2008;138(8):1548S-53S.
80. Hollman PC, Cassidy A, Comte B, Heinonen M, Richelle M, Richling E, et al. The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr.* 2011;141(5):989S-1009S.
81. Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):292S-7S.
82. Zamora-Ros R, Agudo A, Luján-Barroso L, Romieu I, Ferrari P, Knaze V, et al. Dietary flavonoid and lignan intake and gastric adenocarcinoma risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(6):1398-408.

83. Rossi M, Bosetti C, Negri E, Lagiou P, La Vecchia C. Flavonoids, proanthocyanidins, and cancer risk: a network of case-control studies from Italy. *Nutr Cancer*. 2010;62(7):871-7.
84. Ostertag LM, O'Kennedy N, Kroon PA, Duthie GG, de Roos B. Impact of dietary polyphenols on human platelet function--a critical review of controlled dietary intervention studies. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(1):60-81.
85. Bordeaux B, Yanek LR, Moy TF, White LW, Becker LC, Faraday N, et al. Casual chocolate consumption and inhibition of platelet function. *Prev Cardiol*. 2007;10(4):175-80.
86. Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, et al. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(1):30-5.
87. Innes AJ, Kennedy G, McLaren M, Bancroft AJ, Belch JJ. Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets*. 2003;14(5):325-7.
88. Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, et al. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(6):1466-73.
89. Heptinstall S, May J, Fox S, Kwik-Urbe C, Zhao L. Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent in vitro and ex vivo studies in healthy adults. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47 Suppl 2:S197-205; discussion S6-9.
90. Polagruto JA, Gross HB, Kamangar F, Kosuna K, Sun B, Fujii H, et al. Platelet reactivity in male smokers following the acute consumption of a flavanol-rich grapeseed extract. *J Med Food*. 2007;10(4):725-30.
91. Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, et al. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart*. 2006;92(1):119-20.
92. Wang-Polagruto JF, Villablanca AC, Polagruto JA, Lee L, Holt RR, Schrader HR, et al. Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;47 Suppl 2:S177-86; discussion S206-9.
93. Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, Spieker L, Hermann M, Cooper KA, et al. Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation*. 2007;116(21):2376-82.
94. Shenoy SF, Keen CL, Kalgaonkar S, Polagruto JA. Effects of grape seed extract consumption on platelet function in postmenopausal women. *Thromb Res*. 2007;121(3):431-2.
95. Rein D, Paglieroni TG, Pearson DA, Wun T, Schmitz HH, Gosselin R, et al. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J Nutr*. 2000;130(8S Suppl):2120S-6S.
96. Erlund I, Koli R, Alfthan G, Marniemi J, Puukka P, Mustonen P, et al. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(2):323-31.
97. Umar A, Depont F, Jacquet A, Lignot S, Segur MC, Boisseau M, et al. Effects of armagnac or vodka on platelet aggregation in healthy volunteers: a randomized controlled clinical trial. *Thromb Res*. 2005;115(1-2):31-7.

- 
98. Gooderham MH, Adlercreutz H, Ojala ST, Wahala K, Holub BJ. A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effects on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. *J Nutr.* 1996;126(8):2000-6.
99. Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, et al. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(2):255-62.
100. Hubbard GP, Wolffram S, de Vos R, Bovy A, Gibbins JM, Lovegrove JA. 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. *Br J Nutr.* 2006;96(3):482-8.
101. Hubbard GP, Wolffram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *J Thromb Haemost.* 2004;2(12):2138-45.
102. Pearson DA, Paglieroni TG, Rein D, Wun T, Schramm DD, Wang JF, et al. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on ex vivo platelet function. *Thromb Res.* 2002;106(4-5):191-7.
103. Dutta-Roy AK. Dietary components and human platelet activity. *Platelets.* 2002;13(2):67-75.
104. Din JN, Harding SA, Valerio CJ, Sarma J, Lyall K, Riemersma RA, et al. Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man. *Atherosclerosis.* 2008 Mar;197(1):290-6.
105. Lahoz C, Alonso R, OrdovÁS JM, LÓPez-FarrÉ A, De Oya M, Mata P. Effects of dietary fat saturation on eicosanoid production, platelet aggregation and blood pressure. *Eur J Clin Invest.* 1997;27(9):780-7.
106. Smith RD, Kelly CN, Fielding BA, Hauton D, Silva KD, Nydahl MC, et al. Long-term monounsaturated fatty acid diets reduce platelet aggregation in healthy young subjects. *Br J Nutr.* 2003;90(3):597-606.
107. Wolf A, Zalpour C, Theilmeyer G, Wang B-y, Ma A, Anderson B, et al. Dietary l-Arginine Supplementation Normalizes Platelet Aggregation in Hypercholesterolemic Humans. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(3):479-85.
108. O'Kennedy N, Crosbie L, Whelan S, Luther V, Horgan G, Broom JI, et al. Effects of tomato extract on platelet function: a double-blinded crossover study in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(3):561-9.
109. Lazarus SA, Bowen K, Garg ML. Tomato juice and platelet aggregation in type 2 diabetes. *JAMA.* 2004;292(7):805-6.
110. Bordia A, Verma SK. Effect of vitamin C on platelet adhesiveness and platelet aggregation in coronary artery disease patients. *Clinical Cardiology.* 1985;8(10):552-4.
111. Duttaroy AK, Jorgensen A. Effects of kiwi fruit consumption on platelet aggregation and plasma lipids in healthy human volunteers. *Platelets.* 2004;15(5):287-92.

- 
112. Bagger M, Andersen O, Nielsen JB, Rytting KR. Dietary fibres reduce blood pressure, serum total cholesterol and platelet aggregation in rats. *Br J Nutr.* 1996;75(3):483-93.
113. Freedman JE, Keane JF. Vitamin E inhibition of platelet aggregation is independent of antioxidant activity. *J Nutr.* 2001;131(2):374S-7S.
114. EFSA Panel on Dietetic Products NaAN. Guidance on the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. *EFSA Journal* 2011;9(12):2474.
115. Trichopoulou A, Soukara S, Vasilopoulou E. Traditional foods: a science and society perspective. *Trends Food Sci Tech.* 2007;18(8):420-7.
116. Hollands WJ, Saha S, Hayran O, Boyko N, Glibetic M, Konik-Ristic A, et al. Lack of effect of bioactive-rich extracts of pomegranate, persimmon, nettle, dill, kale and Sideritis and isolated bioactives on platelet function. *J Sci Food Agric.* 2013:(in press).
117. PDR for Herbal Medicines. 3rd edition ed. Gruenwald J, Bendler T, Jaenicke C, editors. Montvale (NJ): Thompson PDR; 2004.
118. Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett.* 1999;442(1):89-94.
119. Tahri A, Yamani S, Legssyer A, Aziz M, Mekhfi H, Bnouham M, et al. Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *J Ethnopharmacol.* 2000;73(1-2):95-100.
120. Bnouham M, Merhfour FZ, Ziyyat A, Mekhfi H, Aziz M, Legssyer A. Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia.* 2003;74(7-8):677-81.
121. Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, et al. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2004;94(2-3):317-22.
122. El Haouari M, Bnouham M, Bendahou M, Aziz M, Ziyyat A, Legssyer A, et al. Inhibition of rat platelet aggregation by *Urtica dioica* leaves extracts. *Phytother Res.* 2006;20(7):568-72.
123. Tamme T, Reinik M, Roasto M, Juhkam K, Tenno T, Kiis A. Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. *Food Addit Contam.* 2006;23(4):355-61.
124. Teuber H, Herrmann K. [Flavonol glycosides of leaves and fruits of dill (*Anethum graveolens* L.). II. Phenolics of spices (author's transl)]. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1978;167(2):101-4.
125. Yazdanparast R, Alavi M. Antihyperlipidaemic and antihypercholesterolaemic effects of *Anethum graveolens* leaves after the removal of furocoumarins. *Cytobios.* 2001;105(410):185-91.
126. Bahramikia S, Yazdanparast R. Efficacy of different fractions of *Anethum graveolens* leaves on serum lipoproteins and serum and liver oxidative status in experimentally induced hypercholesterolaemic rat models. *Am J Chin Med.* 2009;37(4):685-99.

127. Janeska B, Stefova M, Alipieva K. Assay of flavonoid aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD. *Acta Pharm.* 2007;57(3):371-7.
128. Kostadinova E, Nikolova D, Alipieva K, Stefova M, Stefkov G, Evstatieva L, et al. Chemical constituents of the essential oils of *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss and Heldr. from Bulgaria and Macedonia. *Nat Prod Res.* 2007;21(9):819-23.
129. Charami MT, Lazari D, Karioti A, Skaltsa H, Hadjipavlou-Litina D, Souleles C. Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). *Phytother Res.* 2008;22(4):450-4.
130. Kim SY, Yoon S, Kwon SM, Park KS, Lee-Kim YC. Kale juice improves coronary artery disease risk factors in hypercholesterolemic men. *Biomed Environ Sci.* 2008;21(2):91-7.
131. Sasaki K, Neyazaki M, Shindo K, Ogawa T, Momose M. Quantitative profiling of glucosinolates by LC-MS analysis reveals several cultivars of cabbage and kale as promising sources of sulforaphane. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012;903:171-6.
132. Sikora E, Bodziarczyk I. Composition and antioxidant activity of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*) raw and cooked. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2012;11(3):239-48.
133. Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules.* 2011;16(1):251-80.
134. Podsędek A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LWT - Food Sci Tech.* 2007;40(1):1-11.
135. Kural BV, Kucuk N, Yucesan FB, Orem A. Effects of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) leaves extracts on the susceptibility of very low and low density lipoproteins to oxidation. *Indian J Biochem Biophys.* 2011;48(5):361-4.
136. Loizzo MR, Said A, Tundis R, Hawas UW, Rashed K, Menichini F, et al. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods Hum Nutr.* 2009;64(4):264-70.
137. Ahn HS, Jeon TI, Lee JY, Hwang SG, Lim Y, Park DK. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: in vitro and in vivo. *Nutr Res.* 2002;22(11):1265-73.
138. Kulling SE, Rawel HM. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) - A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta Med.* 2008;74(13):1625-34.
139. Kokotkiewicz A, Jaremicz Z, Luczkiewicz M. *Aronia* plants: a review of traditional use, biological activities, and perspectives for modern medicine. *J Med Food.* 2010;13(2):255-69.
140. Simeonov SB, Botushanov NP, Karahanian EB, Pavlova MB, Husianitis HK, Troev DM. Effects of *Aronia melanocarpa* juice as part of the dietary regimen in patients with diabetes mellitus. *Folia Med (Plovdiv).* 2002;44(3):20-3.

141. Broncel M, Kozirog-Kolacinska M, Andryskowski G, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Owczarczyk A, et al. [Effect of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on blood pressure, concentration of endothelin-1 and lipids in patients with metabolic syndrome]. *Pol Merkur Lekarski*. 2007;23(134):116-9.
142. Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jeziarska J. *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit*. 2010;16(1):CR28-34.
143. Poreba R, Skoczynska A, Gac P, Poreba M, Jedrychowska I, Affelska-Jercha A, et al. Drinking of chokeberry juice from the ecological farm Dzieciolowo and distensibility of brachial artery in men with mild hypercholesterolemia. *Ann Agric Environ Med*. 2009;16(2):305-8.
144. Kowalczyk E, Kopff A, Niedworok J, Kopff M, Jankowski A. Anthocyanins--an adjunct to cardiovascular therapy? *Kardiologia Pol*. 2002;57(10):332-6.
145. Sikora J, Broncel M, Markowicz M, Chalubinski M, Wojdan K, Mikiciuk-Olasik E. Short-term supplementation with *Aronia melanocarpa* extract improves platelet aggregation, clotting, and fibrinolysis in patients with metabolic syndrome. *Eur J Nutr*. 2012;51(5):549-56.
146. Poyrazoğlu E, Gökmen V, Artık N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *J Food Comp Anal*. 2002;15(5):567-75.
147. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010;9(6):635-54.
148. Needs PW, Kroon PA. Convenient syntheses of metabolically important quercetin glucuronides and sulfates. *Tetrahedron*. 2006;62(29):6862-8.
149. Saha S, Hollands W, Teucher B, Needs PW, Narbad A, Ortori CA, et al. Isothiocyanate concentrations and interconversion of sulforaphane to erucin in human subjects after consumption of commercial frozen broccoli compared to fresh broccoli. *Mol Nutr Food Res*. 2012;56(12):1906-16.
150. Pravilnik o kvalitetu proizvoda od voća, povrća i pečurki i pektinskih preparata. Sl.list SCG 12/2005.
151. Pravilnik o kvalitetu voćnih sokova, koncentrisanih voćnih sokova, voćnih sokova u prahu, voćnih nektara i srodnih proizvoda. Sl. glasnik RS 77/2011.
152. European Pharmacopoeia 6th Edition. Strasbourg Cedex, France: Council of Europe; 2007.
153. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*. 2003;51(3):609-14.
154. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2002;50(10):3010-4.
155. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća. Sl. list SFRJ br. 29/83.

156. Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(10):1202-5.
157. Clothier RH. The FRAME cytotoxicity test. *Methods Mol Biol.* 1995;43:109-18.
158. Honzel D, Carter SG, Redman KA, Schauss AG, Endres JR, Jensen GS. Comparison of chemical and cell-based antioxidant methods for evaluation of foods and natural products: generating multifaceted data by parallel testing using erythrocytes and polymorphonuclear cells. *J Agric Food Chem.* 2008;56(18):8319-25.
159. Frelinger AL, III, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, et al. Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway. *Circulation.* 2006;113(25):2888-96.
160. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(2):565-70.
161. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104(13):1533-7.
162. Karpatkin S, Pearlstein E, Ambrogio C, Collier BS. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J Clin Invest.* 1988;81(4):1012-9.
163. Zec M, Srdic-Rajic T, Konic-Ristic A, Todorovic T, Andjelkovic K, Filipovic-Ljeskovic I, et al. Anti-metastatic and anti-angiogenic properties of potential new anti-cancer drugs based on metal complexes of selenosemicarbazones. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012;12(9):1071-80.
164. Wang J-S, Chang C-Y, Chow S-E, Chen Y-W, Yang C-M. Exercise modulates platelet-nasopharyngeal carcinoma cell aggregation and subsequent tissue factor and matrix metalloproteinase activities. *J Appl Physiol.* 2007;103(3):763-70.
165. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection E, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002. p. 3143.
166. Almajano MP, Carbó R, Jiménez JAL, Gordon MH. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* 2008;108(1):55-63.
167. Pljevljakušić D, Šavikin K, Janković T, Zdunić G, Ristić M, Godjevac D, et al. Chemical properties of the cultivated *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr. subsp. *raeseri*. *Food Chem.* 2011;124(1):226-33.
168. Seeram NP, Adams LS, Hardy ML, Heber D. Total cranberry extract versus its phytochemical constituents: antiproliferative and synergistic effects against human tumor cell lines. *J Agric Food Chem.* 2004;52(9):2512-7.
169. Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson A, Duan RD. Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J Agric Food Chem.* 2004;52(24):7264-71.



170. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem.* 2002;50(25):7449-54.
171. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21 Suppl 2:106-12.
172. Harrison P, Robinson MSC, Mackie IJ, Joseph J, McDonald SJ, Liesner R, et al. Performance of the platelet function analyser PFA-100(R) in testing abnormalities of primary haemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999;10(1):25-32.
173. Oh CH, Shin JI, Mo SJ, Yun SJ, Kim SH, Rhee YH. Antiplatelet activity of L-sulforaphane by regulation of platelet activation factors, glycoprotein IIb/IIIa and thromboxane A2. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2013.
174. Pierre S, Crosbie L, Duttaroy AK. Inhibitory effect of aqueous extracts of some herbs on human platelet aggregation in vitro. *Platelets.* 2005;16(8):469-73.
175. Gadi D, Bnouham M, Aziz M, Ziyat A, Legssyer A, Legrand C, et al. Parsley extract inhibits in vitro and ex vivo platelet aggregation and prolongs bleeding time in rats. *J Ethnopharmacol.* 2009;125(1):170-4.
176. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5):1062-76.
177. Mattiello T, Trifiro E, Jotti GS, Pulcinelli FM. Effects of pomegranate juice and extract polyphenols on platelet function. *J Med Food.* 2009;12(2):334-9.
178. Olas B, Kedzierska M, Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W. Effects of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* on the markers of oxidative stress and blood platelet activation. *Platelets.* 2010;21(4):274-81.
179. Kedzierska M, Olas B, Wachowicz B, Glowacki R, Bald E, Czernek U, et al. Effects of the commercial extract of aronia on oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients after the surgery and various phases of the chemotherapy. *Fitoterapia.* 2012;83(2):310-7.
180. Kedzierska M, Olas B, Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W, Jeziorski A, et al. The nitrative and oxidative stress in blood platelets isolated from breast cancer patients: the protectory action of aronia melanocarpa extract. *Platelets.* 2010;21(7):541-8.
181. Ryszawa N, Kawczynska-Drozd A, Pryjma J, Czesnikiewicz-Guzik M, Adamek-Guzik T, Naruszewicz M, et al. Effects of novel plant antioxidants on platelet superoxide production and aggregation in atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2006;57(4):611-26.
182. Olas B, Wachowicz B, Tomczak A, Erler J, Stochmal A, Oleszek W. Comparative anti-platelet and antioxidant properties of polyphenol-rich extracts from: berries of *Aronia melanocarpa*, seeds of grape and bark of *Yucca schidigera* in vitro. *Platelets.* 2008;19(1):70-7.
183. Luzak B, Golanski J, Rozalski M, Krajewska U, Olas B, Watala C. Extract from *Aronia melanocarpa* fruits potentiates the inhibition of platelet aggregation in the presence of endothelial cells. *Arch Med Sci.* 2010;6(2):141-4.

- 
184. Hadacek F, Bachmann G, Engelmeier D, Chobot V. Hormesis and a Chemical Raison D'etre for Secondary Plant Metabolites. Dose Response. 2011;9(1):79-116.
185. Alessi MC, Juhan-Vague I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2008;99(6):995-1000.
186. Williamson G, Barron D, Shimoi K, Terao J. In vitro biological properties of flavonoid conjugates found in vivo. *Free Radical Res.* 2005;39(5):457-69.
187. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MRA, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: Identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radical Res.* 2001;35(6):941-52.
188. Petri N, Tannergren C, Holst B, Mellon FA, Bao Y, Plumb GW, et al. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(6):805-13.
189. Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, et al. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr.* 2007;137(9):2043-8.
190. Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigné C, Rémésy C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1998;275(1):R212-R9.
191. Kim K, Bae ON, Lim KM, Noh JY, Kang S, Chung KY, et al. Novel antiplatelet activity of protocatechuic acid through the inhibition of high shear stress-induced platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343(3):704-11.
192. Masella R, Santangelo C, D'Archivio M, Li Volti G, Giovannini C, Galvano F. Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms. *Curr Med Chem.* 2012;19(18):2901-17.
193. Köller M, Wachtler P, Dávid A, Muhr G, König W. Arachidonic acid induces DNA-fragmentation in human polymorphonuclear neutrophil granulocytes. *Inflammation.* 1997;21(5):463-74.
194. Pompeia C, Freitas JJS, Kim JS, Zyngier SB, Curi R. Arachidonic acid cytotoxicity in leukocytes: implications of oxidative stress and eicosanoid synthesis. *Biology of the Cell.* 2002;94(4-5):251-65.
195. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 2003;59(2):277-87.
196. Din JN, Harding SA, Valerio CJ, Sarma J, Lyall K, Riemersma RA, et al. Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man. *Atherosclerosis.* 2008;197(1):290-6.
197. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-Selectin: Studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;104(13):1533-7.
198. Kavtaradze NS, Alaniya MD, Aneli JN. Chemical Components of *Urtica dioica* Growing in Georgia. *Chemistry of Natural Compounds.* 2001 2001/05/01;37(3):287-.
199. Natella F, Nardini M, Beelli F, Pignatelli P, Di Santo S, Ghiselli A, et al. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation. *Br J Nutr.* 2008;100(6):1276-82.
-

- 
200. Jirovetz L, Buchbauer G, Stoyanova AS, Georgiev EV, Damianova ST. Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria. *J Agric Food Chem.* 2003;51(13):3854-7.
201. Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, Bruni R, Bianchi A, Chiavarini M, et al. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci.* 2006;78(13):1419-32.
202. Heber D. Pomegranate Ellagitannins. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects.* 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011.
203. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5):1062-76.
204. Al Awwadi NA, Borrot-Bouttefroy A, Umar A, Saucier C, Segur MC, Garreau C, et al. Effect of Armagnac fractions on human platelet aggregation in vitro and on rat arteriovenous shunt thrombosis in vivo probably not related only to polyphenols. *Thromb Res.* 2007;119(4):407-13.
205. Tsang C, Smail NF, Almoosawi S, Davidson I, Al-Dujaili EAS. Intake of polyphenol-rich pomegranate pure juice influences urinary glucocorticoids, blood pressure and homeostasis model assessment of insulin resistance in human volunteers. *J Nutr Sci.* 2012;1:1-9.
206. Weidtmann A, Scheithe R, Hrboticky N, Pietsch A, Lorenz R, Siess W. Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(8):1131-8.
207. Westerbacka J, Yki-Järvinen H, Turpeinen A, Rissanen A, Vehkavaara S, Syrjälä M, et al. Inhibition of platelet-collagen interaction: An in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(1):167-72.
208. Hashemi M, Kelishadi R, Hashemipour M, Zakerameli A, Khavarian N, Ghatrehsamani S, et al. Acute and long-term effects of grape and pomegranate juice consumption on vascular reactivity in paediatric metabolic syndrome. *Cardiol Young.* 2010;20(1):73-7.
209. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuiliez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation.* 1995;91(5):1314-9.
210. Gries A, Bode C, Peter K, Herr A, Böhrer H, Motsch J, et al. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-Selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation.* 1998;97(15):1481-7.
211. Polagruto JA, Schramm DD, Wang-Polagruto JF, Lee L, Keen CL. Effects of flavonoid-rich beverages on prostacyclin synthesis in humans and human aortic endothelial cells: association with ex vivo platelet function. *J Med Food.* 2003;6(4):301-8.
212. Granger DN, Rodrigues SF, Yildirim A, Senchenkova EY. Microvascular responses to cardiovascular risk factors. *Microcirculation.* 2010;17(3):192-205.
-

213. Wolfe KL, Liu RH. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *J Agric Food Chem.* 2008;56(18):8404-11.
214. Cheli F, Baldi A. Nutrition-Based Health: Cell-Based Bioassays for Food Antioxidant Activity Evaluation. *Journal of Food Science.* 2011;76(9):R197-R205.
215. Danesi F, Saha S, Kroon PA, Glibetic M, Konic-Ristic A, D'Antuono LF, et al. Bioactive-rich *Sideritis scardica* tea (mountain tea) is as potent as *Camellia sinensis* tea at inducing cellular antioxidant defences and preventing oxidative stress. *J Sci Food Agric.* 2013;(in press).
216. Sestili P, Martinelli C, Ricci D, Fraternali D, Bucchini A, Giamperi L, et al. Cytoprotective effect of preparations from various parts of *Punica granatum* L. fruits in oxidatively injured mammalian cells in comparison with their antioxidant capacity in cell free systems. *Pharm Res.* 2007;56(1):18-26.
217. Slatnar A, Jakopic J, Stampar F, Veberic R, Jamnik P. The effect of bioactive compounds on in vitro and in vivo antioxidant activity of different berry juices. *PLoS One.* 2012;7(10):e47880.
218. Galvano F, Vitaglione P, Li Volti G, Di Giacomo C, Gazzolo D, Vanella L, et al. Protocatechuic acid: the missing human cyanidins' metabolite. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(3):386-7; author reply 8.
219. Nakamura Y, Torikai K, Ohto Y, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. *Carcinogenesis.* 2000;21(10):1899-907.
220. Babich H, Sedletcaia A, Kenigsberg B. In vitro cytotoxicity of protocatechuic acid to cultured human cells from oral tissue: involvement in oxidative stress. *Pharmacol Toxicol.* 2002;91(5):245-53.
221. Shi GF, An LJ, Jiang B, Guan S, Bao YM. *Alpinia* protocatechuic acid protects against oxidative damage in vitro and reduces oxidative stress in vivo. *Neurosci Lett.* 2006;403(3):206-10.
222. Vari R, D'Archivio M, Filesi C, Carotenuto S, Scazzocchio B, Santangelo C, et al. Protocatechuic acid induces antioxidant/detoxifying enzyme expression through JNK-mediated Nrf2 activation in murine macrophages. *J Nutr Biochem.* 2011;22(5):409-17.
223. Krötz F, Sohn H-Y, Pohl U. Reactive oxygen species: Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004  
24(11):1988-96.
224. Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczyński A. Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets.* 2002;13(3):175-82.
225. Essex DW, Li M. Redox modification of platelet glycoproteins. *Current Drug Targets.* 2006;7(10):1233-41.
226. Kedzierska M, Olas B, Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W, Erler J. Changes of platelet antioxidative enzymes during oxidative stress: the protective effect of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* and grape seeds. *Platelets.* 2011;22(5):385-9.

227. Salonen JT. Antioxidants and platelets. *Ann Med.* 1989;21(1):59-62.
228. Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI, Ferreira D. Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agric Food Chem.* 2009;57(21):10181-6.
229. Li JM, Podolsky RS, Rohrer MJ, Cutler BS, Massie MT, Barnard MR, et al. Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. *J Surg Res.* 1996;61(2):543-8.
230. Ware JA, Heistad DD. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Platelet-endothelium interactions. *N Engl J Med.* 1993;328(9):628-35.
231. Chakrabarti S, Clutton P, Varghese S, Cox D, Mascelli MA, Freedman JE. Glycoprotein IIb/IIIa inhibition enhances platelet nitric oxide release. *Thromb Res.* 2004;113(3-4):225-33.
232. de Lange DW, Verhoef S, Gorter G, Kraaijenhagen RJ, van de Wiel A, Akkerman JW. Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: an explanation for the French paradox. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(8):1308-14.
233. Xu XX, Gao XH, Pan R, Lu D, Dai Y. A simple adhesion assay for studying interactions between platelets and endothelial cells in vitro. *Cytotechnology.* 2010;62(1):17-22.
234. McDougall GJ, Ross HA, Ikeji M, Stewart D. Berry extracts exert different antiproliferative effects against cervical and colon cancer cells grown in vitro. *J Agric Food Chem.* 2008;56(9):3016-23.
235. Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem.* 2005;16(6):360-7.
236. Konrad L, Muller HH, Lenz C, Laubinger H, Aumuller G, Lichius JJ. Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. *Planta Med.* 2000;66(1):44-7.
237. Yazdanparast R, Mianabadi M. The effect of the active component of *Dendrostellera lessertii* on the adhesive property of human platelets and HL-60 cells. *Life Sci.* 2004;75(6):733-9.
238. Cao Y, Cao R, Bråkenhielm E. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J Nutr Biochem.* 2002;13(7):380-90.
239. Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F, Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit Rev Cl Lab Sci.* 2011;48(5-6):197-216.
240. Medina C, Jurasz P, Santos-Martinez MJ, Jeong SS, Mitsky T, Chen R, et al. Platelet aggregation-induced by Caco-2 cells: Regulation by matrix metalloproteinase-2 and adenosine diphosphate. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(2):739-45.

## BIOGRAFIJA

Aleksandra Konić-Ristić je rođena 3. avgusta 1975 u Leskovcu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 1. juna 2002. godine sa srednjom ocenom 9,6. Na istom fakultetu 7. oktobra 2011. godine odbranila je magistarsku tezu pod nazivom “Ispitivanje izotiocijanata iz povrtarskih biljaka familije *Brassicaceae* i njihovog delovanja na proliferaciju malignih ćelija *in vitro*”. Od oktobra 2002. godine do juna 2009. godine bila je zaposlena u Institutu za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, a od jula 2009. godine zaposlena je u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Od 2002. godine učestuje u radu više projekata Ministarstva prosvete i nauke. Deo je istraživačkog tima dva projekta Sedmog okvirnog programa Evropske komisije: „*Sustainable exploitation of bioactive components from the Black Sea Area traditional foods (BaSeFood)*” i “*Beneficial effects of dietary bioactive peptides and polyphenols on cardiovascular health in humans (Bacchus)*”, kao i bilateralnog projekta Republike Srbije i Francuske pod nazivom “*Identification of cellular and molecular targets of plant bioactives on human blood cells: clinical and in-vitro studies*”. Učestvuje i u radu COST akcije Evropske komisije pod nazivom “*Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process (Infogest)*”. U okviru kraćih istraživačkih poseta boravila je u Institutu za istraživanje hrane u Norviču, u Velikoj Britaniji, i Nacionalnom institutu za agronomska istraživanja u Klermon-Feranu, u Francuskoj. Autor je i koautor 18 radova publikovanih u međunarodnim časopisima, od kojih je 8 publikovano u vrhunskim međunarodnim časopisima. Jedan je od koautora poglavlja u knjigama „*Materia Medica for various cancers: Evidence-based anticancer complementary and alternative medicine 2*” i „*Phytochemicals: Occurrence in Nature, Health Effects and Antioxidant Properties*”. Član je Saveza farmaceutskih udruženja Srbije, Srpskog društva za ishranu i Srpskog društva istraživača raka. Govori engleski jezik.

Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima

1. Konić-Ristić A, Šavikin K, Zdunić G, Janković T, Juranić Z, Menković N, Stanković I. Biological activity and chemical composition of different berry juices Food Chem. 2011;125(4):1412-1417;
2. Konić Ristić A, Srdić-Rajić T, Kardum N, Glibetić M Biological activity of *Aronia melanocarpa* antioxidants pre-screening in an intervention study design J Serb Chem Soc. 2013;78 (3):429–443;

Saopštenja sa međunarodnih skupova

1. Glibetić M, Konic-Ristic A, Srdic-Rajic T, Kardum N, Kroon PA, Hollands W, Boyko N. Acute effects of hot water infusions of mountain tea, nettle and dill on platelet function in subjects with metabolic syndrome: a randomised controlled intervention study. Traditional Food International 2012, 4-5<sup>th</sup> October, 2012., Cesena, Italy
2. Konic-Ristic A, Glibetić M, Srdic-Rajic T, Kardum N, Kroon PA, Hollands W. Effects of 6-week of pomegranate juice consumption on platelet function in subjects with metabolic syndrome: a randomised controlled intervention study. Traditional Food International 2012, 4-5<sup>th</sup> October, 2012., Cesena, Italy
3. Srdic-Rajic T, Konic-Ristic A, Arsić A, Zec M, Stojanović F, Kardum D. Effect of acute intake of *Aronia melanocarpa* juice on antioxidative status and platelet function-*ex vivo* study. 11th FENS European Nutrition Conference, 26-29th October, 2011, Madrid, Spain. Abstract book, p.339, pp.27/473.
4. Kardum N, Konic-Ristic A, Glibetić M, Srdic-Rajic T, Kroon PA, Hollands W, Woodcock M, Boyko N. Effects of 6 weeks of pomegranate juice consumption on cardiovascular disease risk biomarkers in subjects with metabolic syndrome: a randomised controlled intervention study. Traditional Food International 2012, 4-5<sup>th</sup> October, 2012., Cesena, Italy.
5. Konic-Ristic A, Stanojkovic T, Srdic-Rajic T, Zdunic G, Savikin K, Glibetić M. Anti-proliferative and cell-cycle effects of chokeberry and pomegranate juices on colon cancer cells *in vitro*. 11th FENS European Nutrition Conference, 26-29th October, 2011, Madrid, Spain. Abstract book, p.364, pp. 27/783.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Александра Конић Ристић

број индекса                   /                  

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај биљних полифенола на активацију тромбоцита и њихову агрегацију  
са ћелијама ендотела, крвним и малигним ћелијама

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 10.05.2013.

  
Александра Конић Ристић



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Конић Ристић

Број индекса \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Студијски програм Броматологија

Наслов рада Утицај биљних полифенола на активацију тромбоцита и њихову агрегацију са ћелијама ендотела, крвним и малигним ћелијама

Ментор Др Иван Станковић, редовни професор Фармацеутског факултета  
Универзитета у Београду

Потписани/а Александра Конић Ристић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 10.05.2013.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Утицај биљних полифенола на активацију тромбоцита и њихову агрегацију са ћелијама ендотела, крвним и малигним ћелијама**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10.05.2013.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.