Laboratorijsko ispitivanje i računalno simuliranje antiagregacijskog učinka polifenola

Bojić, Mirza

Doctoral thesis / Disertacija

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:983580

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Mirza Bojić

LABORATORIJSKO ISPITIVANJE I RAČUNALNO SIMULIRANJE ANTIAGREGACIJSKOG UČINKA POLIFENOLA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.

University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Mirza Bojić

EXPERIMENTAL DETERMINATION AND COMPUTATIONAL DESIGN OF ANTIAGGREGATORY EFFECT OF POLYPHENOLICS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012

Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Mirza Bojić

LABORATORIJSKO ISPITIVANJE I RAČUNALNO SIMULIRANJE ANTIAGREGACIJSKOG UČINKA POLIFENOLA

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Marica Medić-Šarić
doc. dr. sc. Željko Debeljak

Zagreb, 2012.



University of Zagreb
FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Mirza Bojić

EXPERIMENTAL DETERMINATION AND COMPUTATIONAL DESIGN OF ANTIAGGREGATORY EFFECT OF POLYPHENOLICS

DOCTORAL THESIS

Supervisors: Professor Marica Medić-Šarić, PhD
Assistant Professor Željko Debeljak, PhD

Zagreb, 2012

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Zavodu za farmaceutsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u sklopu projekta „Biološki aktivni spojevi, metaboliti i QSAR” Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (006-0061117-1237).

No man is an island entire of itself; every man is a piece of the continent, a part of the main.
Puno je pojedinaca koji su na ovaj ili onaj način doprinijeli nastanku ovog rada, a čiji doprinos treba ostati zabilježen. Stoga zahvalu upućujem prof. dr. sc. Marici Medić-Šarić – mentorici i učiteljici koja mi je omogućila i vodila izradu doktorata s puno zadovoljstva i korisnih savjeta; doc. dr. sc. Željku Debeljaku – na mnogobrojnim diskusijama i plodonosnim raspravama; dr. sc. Maji Tomičić i prof. dr. sc. Siniši Tomiću na savjetodavnoj i stručnoj potpori u ostvarivanju eksperimentalnog dijela rada.
Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za farmaceutsku kemiju, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Odsjeka za imunogenetiku trombocita i leukocita i hemostazu, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Odjela za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek koji su pokazali puno razumijevanja i tolerancije tijekom izrade rada te stvorili ugodnu radnu atmosferu.
Velika zahvala ide mojoj maloj obitelji i velikoj familiji čiji sam ponos i dika bio od malih nogu.

SAŽETAK

Uvod: Među prirodnim spojevima prisutnim u svakodnevnoj prehrani,flavonoidi su pokazali povoljan učinak u prevenciji kardiovaskularnih bolesti koji se, barem djelomično, može pripisatiantiagregacijskom učinku. S obzirom na farmakološki interes, u potrazi za antitrombocitnim lijekovima, potrebna je sustavna eksperimentalna procjena antiagregacijskog učinka flavonoida. Takvi podaci mogli bi služiti za QSAR modeliranjeantiagregacijskogučinka, istraživanje signalnih putova i procjenu utjecaja na *invitro* testove agregacije trombocita.

Materijali i metode: Skup od trideset flavonoida, odabran je za procjenu antiagregacijskog učinka, na uzorcima pune krvi pomoću Multiplate®funkcionalnog analizatora (Dynabyte, Njemačka) i ADP-a (ADPtest) kao slabog agonistaagregacije. Pet učinkovitihflavonoida iz ADPtesta je analizirano s četiri dodatnaagonistaagregacije (arahidonska kiselina, kolagen, ristocetin i TRAP-6). Za računalno simuliranje antiagregacijskog učinka, generirano je 155 molekulskih deskriptora koji opisuju fizikalno-kemijska, odnosno globalna svojstva molekula i supstituenata. Od računalnih metoda za procjenu mehanizama djelovanja primijenjeno je hijerarhijsko formiranje klasteravišedimenzijskim ponovnim uzorkovanjem.Slučajna šuma, metoda statističkog učenja, korištena je za QSAR modeliranje.

Rezultati: Laboratorijski rezultati su iskazani kao minimalna koncentracija flavonoida koja dovodi do statistički značajnog smanjenja agregacije trombocita u odnosu na netretirani uzorak (minimalna antiagregacijska koncentracija–*MINaAC*). *MINaAC*flavonoida, u pojedinim testovima agregacijekoja je potaknutaADP-om, kolagenom, TRAP-6 i ristocetinom, bila je u sljedećim rasponima: 0,12–122,07μM; 15,26–244,14 μM; 15,26–122,07μM i 0,06–15,26 μM. U testu agregacije trombocita koja je potaknutaarahidonskom kiselinom,proagregacijski učinak je zapažen kod pinocembrin-7-metiletera, epikatehina, hesperetina i 3,6-dihidroksiflavona. Literaturni su podaci bili nedostatni za interpretaciju rezultata dobivenih tvorbom hijerarhijskih klastera uslijed raznolikih mehanizama djelovanja pojedinih flavonoida. Validacija predviđanja učinka koja se temelji na metodi slučajne šume, rezultirala je niskom točnošću predviđanja od 40,67%.

Zaključci: Mjerljivantiagregacijski učinak, na submikromolarnoj razini koncentracija flavonoida, sugerira da i svakodnevna konzumacija flavonoida prehranom može utjecati na *in vivo*agregaciju trombocita, što ukazuje i na njihovu moguću terapijsku primjenu.Temeljemantiagregacijskih testova s različitim induktorima agregacije, može se zaključiti da flavonoidi interferiraju s *invitro*agregacijom trombocita,iliantiagregacijski ili proagregacijski, što može utjecati na interpretaciju testova agregacije trombocita na punoj krvi. Razvoj pouzdanog QSAR modela onemogućuju raznovrsni mehanizmi djelovanja flavonoidakojima se ostvaruje antiagregacijski učinak. Stoga se daljnja istraživanja trebaju usmjeriti napojedinačne mete i na povećanje broja analiziranih supstancija.

Ključne riječi: flavonoidi; trombociti; testovi agregacije; QSAR modeliranje.

SUMMARY

Background: Among natural compounds, present in every day diet, flavonoids have shown beneficial effect in prevention of cardiovascular diseases that can be attributed, at least partially, to theirantiaggregatory activity. Due to the ever increasing pharmacological interest in antiplatelet agents, a systematic experimental evaluation of large flavonoid series is needed. This will serve as possible data set for QSAR modeling of antiaggregatory activity, assessment of signaling pathways and evaluation of the *in vitro* effects of flavonoids on platelet aggregation in whole blood.

Material and methods: A set of thirty flavonoid aglycones was selected for the evaluation. Aggregation measurements were performed on the whole blood sampleswith multiple platelet functional analyzer (Dynabyte, Germany) and adenosine diphosphate (ADPtest) as a weak agonist of aggregation. Five potent flavonoids from the ADPtest were further analyzed using the four additional aggregation inducers (arachidonic acid, collagen, ristocetin and TRAP-6). Computational design of antiaggregatory effect was based on 155 molecular descriptors of physical and chemical properties; global properties of molecule and substituents. Method for the assessment of the possible mechanisms of actionused was hierarchical clustering with multiscale bootstrap resampling. Random forest, a statistical learning method, was used for QSAR modeling.

Results: Laboratory results were expressed as minimal concentration of flavonoid that can significantly lower the platelet aggregation compared to the corresponding untreated sample (minimal antiaggregatory concentration –*MINaAC*). *MINaAC* of flavonoids in individual tests were reported in the following ranges: 0.12–122.07μM; 15.26–244.14 μM; 15.26–122.07 μM; and 0.06–15.26 μM for ADP, collagen, TRAP-6 and ristocetin aggregation-inducers, respectively. When arachidonic acid was used for induction of platelet aggregation, a proaggregatory effect was observed for pinocembrin-7-methylether, epicatechin, hesperetin and 3,6-dihydroxyflavone. Literature data was inconclusive for proper interpretation of hierarchical clustering due to different mechanism by which flavonoids achieve antiaggregatory effect. Validation of random forest prediction model resulted in 40.67% accuracy.

Conclusions: Measurable antiplatelet activity established at submicromolar flavonoid concentrations suggests that even a dietary consumption of some flavonoids can make an impact on *in vivo* aggregation of platelets. These findings also point out a therapeutic potential of some flavonoids. Based on the test with different agonists of aggregation it can be concluded that flavonoids interfere with *in vitro* platelet aggregation assays exhibiting either anti- or pro-aggregatory influencing the interpretation of the results of platelet aggregation. Development of reliable QSAR model under described settings is not possible due to different mechanisms responsible for antiaggregatory effect. Further studies should focus on specific targets; number of the analyzed substances should be increased.

Keywords: flavonoids; platelets; aggregation assays; QSAR modeling.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Polifenoli. Flavonoidi i fenolne kiseline 2

1.2. Agregacija trombocita 5

1.2.1. Antiagregacijski lijekovi 7

1.2.2. Pretrage agregacije trombocita 9

1.3. Računalno simuliranje biološkog učinka 10

1.3.1. Molekulski deskriptori 10

1.3.2. Strojno učenje bez učitelja. Dendrogrami i formiranje klastera 11

1.3.3. Strojno učenje s učiteljem. Slučajna šuma 13

1.4. Flavonoidi, agregacija trombocita i QSAR – literaturni pregled 15

2. OBRAZLOŽENJE TEME 18

3. MATERIJALI I METODE 20

3.1. Materijali 21

3.2. Metode 24

3.2.1. Impedancijska agregometrija 24

3.2.2. Određivanje minimalne antiagregacijske koncentracije 25

3.2.3. Molekulski deskriptori 27

3.2.4. Računalno simuliranje antiagregacijskog učinka 37

4. REZULTATI I RASPRAVA 39

4.1. Učinak flavonoida na agregaciju trombocita koja je potaknuta ADP-om 40

4.2. Mehanizmi antiagregacijskog i proagregacijskog učinka flavonoida 49

4.3. Računalna simulacija antiagregacijskog učinka 54

5. ZAKLJUČCI 71

6. LITERATURA 74

7. PRILOZI 88

A. Kvalifikacijski radovi 89

B. Informirani pristanak i obavijest dobrovoljnom davatelju krvi 103

8. ŽIVOTOPIS 105

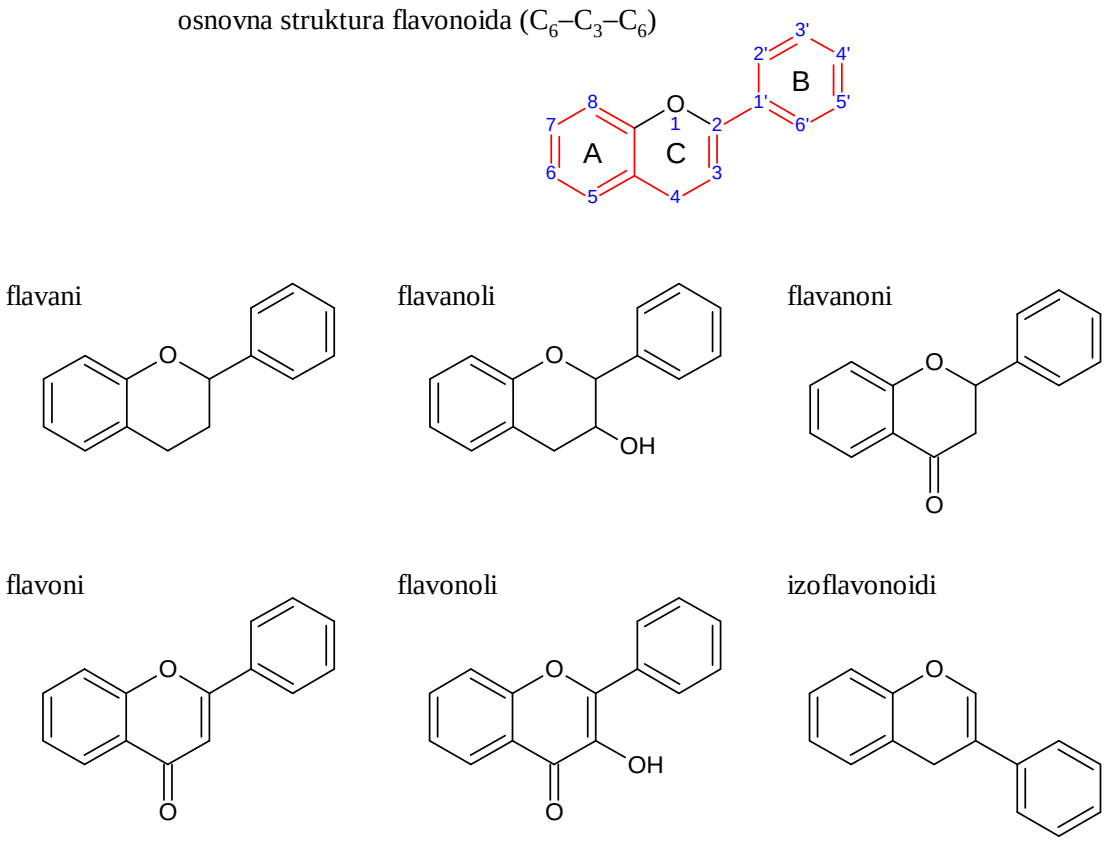
Popis objavljenih znanstvenih radova citiranih u *CurrentContentsu* 107

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD 108

1.1. Polifenoli. Flavonoidi i fenolne kiseline

Pojam polifenola u širem smislu obuhvaća spojeve s fenolnom–OH skupinom na aromatskoj jezgri. U užem smislu pod polifenolimase podrazumijevaju flavonoidi i fenolne kiseline.

Flavonoidi su spojevi sveprisutni u biljnom svijetu i ne mogu se sintetizirati u ljudskom organizmu. Do danas je identificirano više od 4000 spojeva iz ove skupine. Kemijski, to su hidroksilirani derivati benzopirana koji u biljnim smolama dolaze u obliku aglikona, glikozida ili metiliranih derivata (Havsteen 1983., Peterson i Dwyer 1998.). Skelet aglikonaflavonoida ima oblik C_6–C_3–C_6 – benzenski prsten (A) kondenziran s piranom (C) koji na položaju C2 ima vezanu fenilnu skupinu (B) (slika 1).

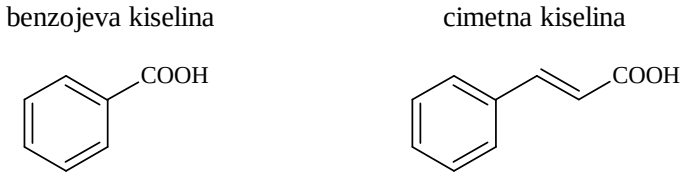


Slika 1. Osnovna struktura i klase flavonoida.[1]

[1] Navedene su klase flavonoida koje su analizirane u ovom radu. U flavonoide se također ubrajaju:antocijanidini – derivatikromenija, a flavani uključuju i leukoantocijanidine, proantocijanidine i tanine koji dolaze u obliku monomera, dimera ili trimera.

Podjela flavonoidana klase temeljise na strukturi prstena C. Osnovna struktura odgovara flavanima. Ukoliko je flavanhidroksiliran na položaju C3 riječ je o flavanolima (katehinima). Flavanoni imaju keto-skupinu na položaju C4. Ako je veza između C2 i C3 dvostruka,flavanoni se nazivaju flavonima.Flavonis hidroksilnom skupinom na položaju C3 nazivaju se flavonolima. Izoflavonoidi imaju fenilni prsten B na položaju C3 (slika 1).Prirodni se flavonoidi razlikuju po hidroksilacijiaglikona na položajima C3, C5, C7, C3', C4' i C5'. Glikozidi nastaju vezanjem šećera (uglavnom ramnoze, glukoze, glukoramnoze, galaktoze i arabinoze) na položajima C3 i C7 (Havsteen 2002.).

Fenolnesu kiseline aromatski sekundarni metaboliti biljaka. Strukturno se dijele na derivate benzojeve kiseline (C_6–C_1), koji mogu biti konjugirani sa šećernim i organskim kiselinama ili vezani za staničnu stijenku u obliku lignina, te derivate cimetne kiseline (C_6–C_3) koji su često u konjugiranim oblicima, a slobodni se javljaju kao produkti kemijske ili enzimske hidrolize (slika 2). Derivati benzojeve i cimetne kiseline u biljkama su rasprostranjeni u sjemenkama, listovima, korijenju i stabljikama. Samo mala količina postoji u obliku slobodnih kiselina, a ostatak je vezan u obliku estera, etera ili acetalnim vezama na strukturne komponente biljke ili na veće polifenole (flavonoide) odnosno male organske molekule. Fenolne kiseline nisu jednoliko raspoređene po biljnim tkivima, a količina ovisi i o stadiju sazrijevanja (Macheix i sur. 1990., Robbins 2003.).



Slika 2. Osnovne strukture fenolnih kiselina.

Flavonoidi strukturno nalikuju nukleozidima, izoaloksazinu i folnoj kiselini. Odlikuje ih visoka kemijska reaktivnost. Vežu se na endogene makromolekule (enzime, DNK, hormonske nosače), keliraju metalne ione, kataliziraju prijenos elektrona, te se lako oksidiraju (Havsteen 2002.). Strukturna sličnost i kemijska reaktivnost predstavlja osnovu za objašnjavanje uloga flavonoida u patofiziološkim procesima. Tako pojedini flavonoidi snižavaju očni tlak, lokalno smanjuju bol i normaliziraju tjelesnu temperaturu uslijed upale, povoljno djeluju na alergije

stabilizacijom mastocita i sprječavanjem sekrecije histamina. Mnogi flavonoidi djeluju antibakterijski, te antivirusno i citostatički(Barbarić i sur. 2011., Chang i sur. 2010., Harborne i Williams 2000., Loke i sur. 2010., Medić-Šarić i sur. 2009., Sumpio i sur. 2006.).

Antioksidacijski učinak flavonoidaje najbolje ispitan (Jasprica i sur. 2007., Parađiković i sur. 2011., Vinković Vrček i sur. 2011.). Flavonoidi kao antioksidansi mogu djelovati u stanjima oksidativnog stresa koja se povezuju s neurodegenerativnim bolestima (Parkinsonova i Alzheimerova bolest), koronarnim bolestima, upalama, ishemijom, tumorima, aterosklerozom i dr. Ovaj antioksidacijski učinak ne ovisi samo o flavanskoj jezgri, već i o rasporedu supstituenata, prvenstveno hidroksilnih skupina na prstenima A i B. Antioksidacijsko se djelovanje smanjuje glikozilacijomaglikona te O-metilacijom zbog utjecaja na lipofilnost i molekulskuplanarnost. Flavonoidi pokazuju i sposobnost keliranja metala s prooksidativnim učinkom (bakra i željeza), čime smanjuju njihov potencijal za stvaranje slobodnih radikala (Bors i sur. 1990., Burda i Oleszek 2001., Pietta 2000., Rice-Evans i sur. 1996.).

Molekule flavonoida, ovisno o supstitentima, pokazuju i hidrofilnu i lipofilnu prirodu temogu inaktivirati reaktivne radikale stvorene unutar stanice, ali i one koji napadaju stanice izvana. Topljivi su u membranama, pa su naročito pogodni za supresiju slobodnih lipidnihradikala, kao i za održavanje vitamina E i C u aktivnim reduciranim oblicima, čime se zadržava antioksidacijska sposobnost stanice (Walle 2004.).

Novija klinička ispitivanja potvrđuju pozitivan učinak flavonoida na ljudsko zdravlje. Takonpr.antocijaninismanjuju rizik od nastanka dijabetesa tipa II (Wedick i sur. 2012.). Umjerena konzumacija flavonoida smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti (McCullough i sur. 2012.), a hrana bogata izoflavonoidima (tofu – soja i druge mahunarke) štiti od raka endometrija (Ollberding i sur. 2012.).

1.2. Agregacija trombocita

Trombociti ili krvne pločice male su diskoidne stanice bez jezgre, promjera od 2 do 4 μm. U procesu nastanka krvnih stanica – hematopoezi, trombociti nastaju fragmentacijom megakariocita. Životni je vijek trombocita od 8 do 12 dana, a referentni interval broja trombocita u zdravih odraslih osoba iznosi(158 – 424) x 10^9/L.Uloga je trombocita u hemostazi dvojaka: adhezivna i prokoagulativna. Svojom adhezivnom i kohezivnom sposobnošću omogućuju stvaranje hemostatičkog čepa, aktiviraju koagulacijske mehanizme te izražavanjem površinskih fosolipida služe kao katalitičko mjesto za proces zgrušavanja(Escolar 1991., Jurk i Kehrel 2005., Shantsila i sur. 2008., www.platelet-reserach.org).

Hemostaza (grč. αιμόστασις, αίμα – krv i στάσις – staza) je složen slijed procesa koji u fiziološkim uvjetima dovode do sprječavanja, odnosno prekida krvarenja. Glavni su događaji u hemostazi: vaskularna faza, adhezija trombocita, agregacija trombocita, degranulacija trombocita, stvaranje ugruška i fibrinoliza. Primarnuhemostazu karakteriziraju faze inicijacije (aktivacija trombocita kolagenom), ekstenzije (trombin, ADP, TxA_2) i perpetuacije (nastanak primarnog hemostatičkog čepa).Sekundarna hemostaza obuhvaća stanično bazirano zgrušavanje i nastanak sekundarnog hemostatičkog čepa (tromba), nakon čega slijedi fibrinoliza (razgradnja ugruška i zarastanje ozljede) (Bras i Stalker 2008., O'Malley 2010.).

U fiziološkim uvjetima trombociti se aktiviraju kontaktom s kolagenom uslijed izlaganja subendotelnog vezivnog tkiva. Kako bi se olakšalo vezanje kolagena na receptore u uvjetima kontinuiranog protoka krvi, vezanje kolagena na glikoproteineGP Ia/IX/V i GP IIb/IIIa posredovano je vonWillebrandovim faktorom. Aktivirani GP Ia/IX/V kompleks potiče aktivaciju integrina GP IIb/IIIa, dok se GP Ia/IIa i GP VI aktiviraju neposrednim vezanjem kolagena. U načelu, svi aktivirani receptori potiču signalne putove koji uključuju tirozin-kinaze (npr. Syk), a vode aktivaciji fosfolipaze C (PLC). Kolagen potiče aktivaciju PLCγ dok trombin, TxA_2 i ADP aktiviraju manje učinkovitu PLCβ. Uloga PLC je hidroliza fosfatidilinozitoldifosfata (PIP_2) na inozitoltrifosfat (IP_3) i diacilglicerol (DAG). Povećanje koncencentracijeIP_3dovodi do otvaranja kalcijevih kanalagustih tjelešaca[2] i plazmatske membrane te povećava citoplazmatsku koncentraciju kalcija. Kalcij, kao sekundarni glasnik, potiče niz unutarstaničnih procesa do aktivacije i morfoloških promjena trombocita

[2]Gusti tubularni sustav (engl. *densetubularsystem*, DTS) odgovara glatkom endoplazmatskomretikulumu drugih stanica.

uključujući sekreciju vezikula s ADP-om i nastajanje TxA_2.Povećanje koncentracije DAG dovodi do aktivacije protein-kinaze C (PKC) koja regulira treoninske i serinskekinaze te izgled citoskeleta (Clemetson i Clemetson 2004., Harburger i Calderwood 2009., Ikeda i sur. 2008., Rivera i sur. 2009.).

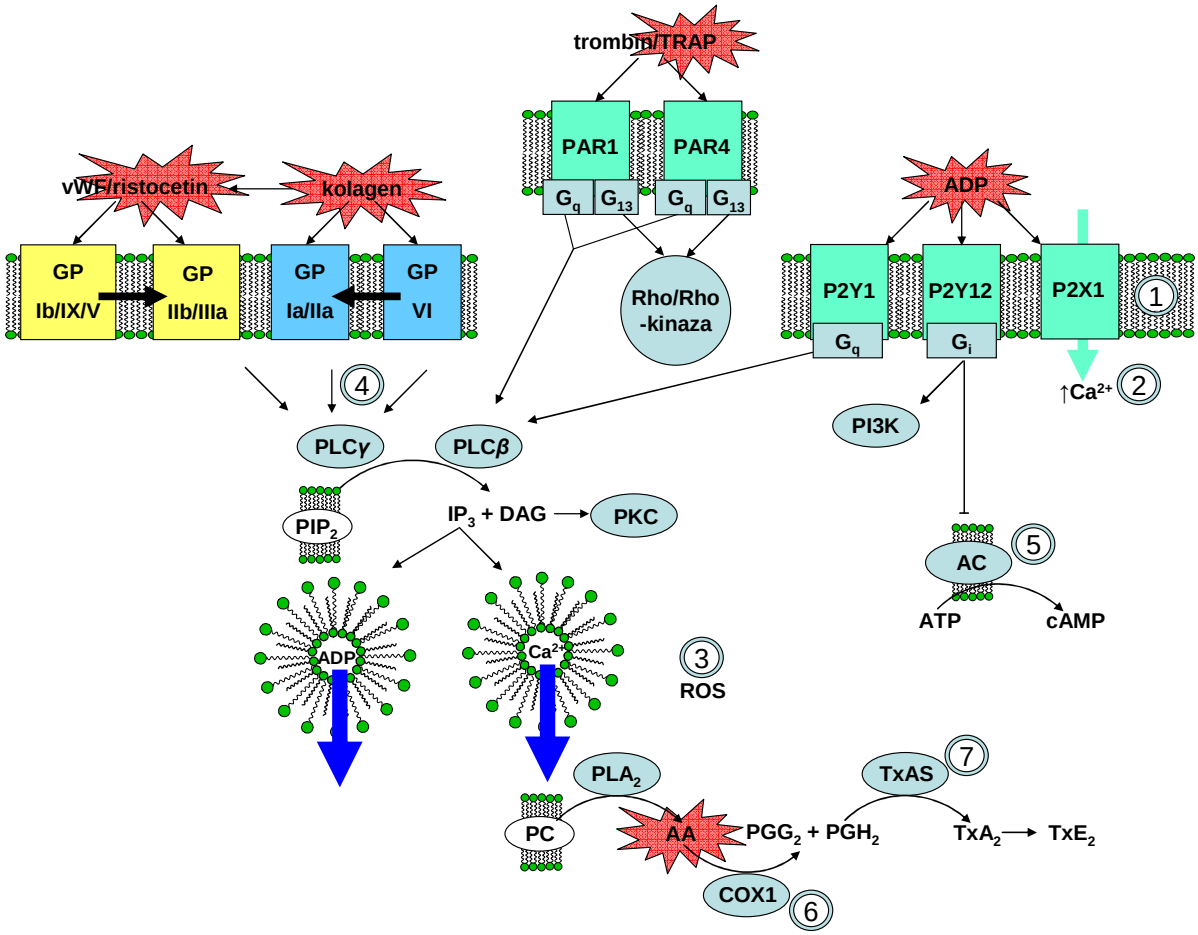
Trombin je serinskaproteazakoja djeluje putem receptora 1 (PAR1) i 4 (PAR4) koji su aktivirani proteazom.Trombin oslobađa odgovarajući aminokiselinski slijed N-terminalnog kraja tedolazi do aktivacije receptora.Aminokiselinski slijed Ser–Phe–Leu–Leu–Arg–Asn aktivira PAR1, a Gly–Tyr–Pro–Gly–Lys–Phe PAR4. *Invitro* se za jačepoticanjeagregacije koristi primarno aminokiselinska sekvenca za aktivaciju PAR1.[3]Oba PAR-receptora djeluju preko dva signalna puta posredovana G-proteinimaRho/Rho-kinaza (G_{13}) i prethodno opisanim IP_3/DAG (G_q) signalnim putom. Aktivacijom Rho/Rho-kinaza signalnog puta dolazi do promjena u aktinskim vlaknima citoskeleta te formiranja filopodija i lamelopodija, odnosno promjene oblika trombocita (Andersen i sur. 1999., Bras i Stalker 2008., Bretschneider i sur. 2001.).

Adenozin-difosfat (ADP) na mjestu ozljede oslobađaju oštećeno tkivo i eritrociti, odnosno aktivirani trombociti. Djelovanje ADP-a se ostvaruje putem tri receptora za nukleotide: P2Y1, P2Y12 i P2X1. P2Y1 receptor je sparen s G_q proteinom koji djeluje IP_3/DAG signalnim putem analogno trombinu. P2Y12 receptor je sparen s G_i proteinom koji suprimira nastanak cAMP i promiče aktivnost PI3-kinaze (PI3K). cAMP antagonizira agregaciju, nastaje djelovanjem adenilatciklaze (aktivator prostaciklin, PGI_2), a razgrađuje se katalitičkim učinkom fosfodiesteraze (inhibitor NO).P2X1 je kationski kanal ovisan o ATP-u, a omogućuje prijenos kalcija u stanicu (Bras i Stalker 2008., Sibelernagl i Lang 2000.).

Čak se i jaki agonistiagregacije, kao kolagen i trombin, oslanjaju na agregacijski učinak ADP-a i TxA_2, potpomognuti djelovanjem adrenalina *in vivo*(supresija cAMP). DAG potiče djelovanje fosfolipaze A2 (PLA2) koja prevodi fosfatidilkolin (PC) u arahidonsku kiselinu. Djelovanjem prostaglandin H sintaze (PGHS), odnosno ciklooksigenaze (COX), nastaju prostaglandini PGG_2 i PGH_2. Tromboksan A_2sintaza (TxAS) prevodi PGH_2 u kratkoživući, ali jakagonistagregacije TxA_2 (Bras i Stalker 2008.).

Na slici 3 prikazani su opisani signalni putovi koji vode do agregacije trombocita.

[3]Heksapeptidni aktivator receptora trombina (engl. *thrombin receptor activator for peptide 6*, TRAP-6).



Slika 3. Pojednostavljeni prikaz signalnih putova agregacije trombocita, koja je potaknuta različitim agonistimaagregacije primijenjenim u ovom istraživanju. Poznati su mehanizmi antiagregacijskog učinka flavonoida označeni brojevima koji odgovaraju onima iztablice2.

1.2.1. Antiagregacijski lijekovi

Aktivacija i agregacija trombocita ključni su događaji u formiranju tromba koji može prouzročiti duboku vensku trombozu, plućnu emboliju, infarkt miokarda, moždani udar i sl. Kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti vodeći su uzrok smrti u razvijenim zemljama, stoga se velik napor ulaže u pronalaženje novih antitrombotičkih lijekova[4]. Pregled antiagregacijskih lijekova prikazan je u tablici 1.

[4]Antritrombotici su lijekovi koji sprječavaju nastanak tromba. Ukoliko djeluju na agregaciju trombocita nazivaju se antiagregacijskim lijekovima, a djeluju li na sekundarnu hemostazu, odnosno koagulacijsku kaskadu, nazivaju se antikoagulansima.

Tablica 1. Antiagregacijski lijekovi: mehanizam djelovanja i osnovne značajke. (Angiolillo i sur. 2012.,Ancrenaz i sur. 2010., AntithromboticTrialists' Collaboration 2002., Cox 2008.)

Zahvatna točka		
Lijek	**Značajke**	**Komentar**
ciklooksigenaza 1		
acetilsalicilna kiselina	nuspojave: posljedica inhibicije netrombocitnih COX enzima	Terapija je uspješna u 25% slučajeva.
receptor ADP-a P2Y12		
tiklopidin	nuspojave: trombocitopenija, neutropenija polimorfizam CYP2C19	Tienopiridini su prolijekovi čiji se aktivan oblik ireverzibilno veže na P2Y12 receptor. Tikagrelor i kangrelor su nukleozidni, odnosno nukelotidni reverzibilni inhibitori P2Y12 receptora – primjena u pre/operacijskim stanjima jer se postoperacijski brzo uspostavlja normalna hemostaza.
klopidogrel		
prasugrel		
tikagrelor		
kangrelor		
glikoproteinIIb/IIIa		
abciksimab	monoklonsko protutijelo	Ova skupina lijekova ne djeluje na aktivaciju trombocita, već inhibiraagregaciju. Iako antagoniziraju povezivanje trombocita preko fibrinogena, glavna mana im je poticanje aktivacije trombocita agonističkim djelovanjem na signalne putove GP IIb/IIIa i i.v. primjena.
eptifibatid	peptid	
tirofinab	nepeptidna struktura	
fosfodiesteraza		
dipiridamol	inhibitorcAMPfosfodiesteraza inhibitor PDE3	Dipiridamol ima više mehanizama djelovanja (inhibira sintezu TxA_2, povećava izvanstaničnukonc. adenozina), slab je inhibitor aktivacije i agregacije trombocita. Kao i ostali lijekovi iz ove
cilostazol		

	skupine, primarno djeluje vazodilatacijski.

Iako postoje mnoge potencijalne mete, niti jedan noviji lijek nije uspio potisnuti najčešće primjenjivane, acetilsalicilnu kiselinu i klopidogrel. Oba lijeka su ireverzibilni inhibitori, pa se željena funkcija trombocita uslijed krvarenja ne može uspostaviti samo prestankom uzimanja lijeka. Utjecaj na agregaciju potrebno je pratiti funkcionalnim testovima na osnovi kojih se može prilagoditi doza. To je posebice važno za klopidogrel koji se aktivira katalitičkim djelovanjem CYP2C19 – enzima podložnog genetskom polimorfizmu. Nuspojave klopidogrela uključuju teške oblikeneutropenije i trombocitopenije – trombotičnatrombocitopenična purpura, a nuspojave acetilsalicilne kiseline iskazuju se kao gastropatije, nefrotoksičnost i pseudoalergijska reakcija (astma) (Cox 2008., Francetić i sur. 2010., Jackson 2011., Sibbing i sur. 2010., Sweetman 2011.). Stoga potraga za sigurnijim lijekom, s manje nuspojava i lakšom kontrolom učinka, i dalje traje.

1.2.2. Pretrageagregacije trombocita

Funkcionalni testovi agregacije obuhvaćaju spontane i inducirane testove. Vrijeme krvarenja je spontani i najstariji test agregacije kojim se određuje razdoblje potrebno za prestanak krvarenja iz standardizirane posjekotine. Rezultati ove pretrage su nekonzistentni, a uvelike ovise o vještini tehničara, debljini kože na ubodnom mjestu i temperaturi. Stoga se danas zamjenjuje s automatiziranom inačicom –analizatorom funkcije trombocita (engl. *plateletfunctionanalyzer*, PFA®, Siemens, Njemačka). Princip rada PFA® temelji se na adheziji i agregaciji trombocita oponašanjem fizioloških uvjeta protoka krvi u krvnim žilama u prisutnosti induktora agregacije, pri čemu se mjeri vrijeme nastanka trombocitnog ugruška.Iako ova metoda oponaša *in vivo* uvjete, nedostatak su samo tri dostupne izvedbe s kombinacijom induktora agregacije (kolagen/adrenalin, kolagen/ADP, ADP/prostaglandin E_1/$CaCl_2$) (Hillman-Wiseman 2010., Shantsila i sur. 2008.).

Optička se agregometrija zasniva na mjerenju pada apsorbancije uslijed stvaranja agregata trombocita, potaknutog različitim induktorima agregacije. Glavna je prednost ove tehnike povezivanje trombocita preko GP IIb/IIIa receptora i velik broj primjenjivih induktora agregacije (ADP, adrenalin, kolagen, arahidonska kiselina, peptidni aktivatori receptora trombina, TxA_2mimetici). Ova je metodadugotrajna,zbog nužnosti priprave plazme bogate trombocitimauz standardizaciju broja trombocita, što je njezin glavni nedostatak.Tehnika je

podložna intralaboratorijskim varijacijama i ne može se primjenjivati na lipemičnim uzorcima (McCabe White i Jennings 1999., Shantsila i sur. 2008.).

Impedancijska se metoda zasniva na mjerenju porasta otpora uslijed potaknute agregacije trombocita na elektrodama. Prednosti su ove metode jednostavnost i brzina. Dodatna obrada krvi (priprema plazme bogate trombocitima) nije potrebna.Može se provoditi s različitim induktorima agregacije, a za ispitivanje se koriste male količine krvi (samo 300 µL), što ju čini pogodnom za istraživačke svrhe kao što je rad na animalnim modelima(Calatzis i sur. 2006., Jámbor i sur. 2009., Kalbantner i sur. 2009.).

1.3. Računalno simuliranje biološkog učinka

Kvalitativno ispitivanje odnosa strukture i djelovanja (engl. *structureactivity-relationship*, SAR)opisuje utjecaj strukture ili strukturnih svojstava na aktivnosti proučavanih spojeva, dok se QSAR (engl. *quantitativestructure-activity relationship*) bavi pronalaženjem kvantitativne veze između molekulske strukture i učinka. Prva primjena QSAR-a seže u 1863. godinu kada je objavljen doktorski rad na temu toksičnosti primarnih alifatskih alkohola i njihove topljivosti u vodi (Cros 1863.). Stoljeće i pol poslije QSAR se afirmira u toksikologiji i kozmetici u okviru europske zakonske regulative, kao zamjena za testiranja na životinjama (REACH 2006.).

Prema osnovnom postulatu QSAR-a, aktivnost je posljedica kemijske strukture. Dakle fizička, kemijska i biološka svojstva su posljedica strukturnih karakteristika molekule kao što su geometrijska, elektronska, hidrofobna i druga svojstva (Selassie 2003.).Za postavljanje QSAR modela potreban je skupmolekula poznate aktivnosti, skup molekulskih deskriptora koji opisuju strukture molekula i način povezivanja – statističke metode analize koje sežu od jednostavne linearne regresije do strojnog učenja.

1.3.1. Molekulski deskriptori

Molekulski su deskriptori rezultat logičkih i matematičkih transformacija kemijske informacije. Dijele se na teorijske i eksperimentalne.Teorijski deskriptori pretvaraju strukturu u koristan broj.Eksperimentalni deskriptori predstavljaju rezultat nekog standardiziranog pokusa (Todeschini i Consonni, 2000.). Eksperimentalni deskriptori opisuju fizikalna svojstva

molekula, kao što su log*P*, polarizabilnost, molekulska refraktivnost, dipolni moment i dr. Teorijski molekulski deskriptori temelje se na simboličkom prikazu molekule, a prema dimenzionalnostistrukturne informacije dijele se na:

- 0D – opisuju svojstva molekula na osnovi sažete molekulske formule, npr. broj atoma
- 1D – opisuju svojstva supstituenata, fragmenata, funkcionalnih skupina
- 2D – opisuju veze između atoma u molekuli – topološki indeksi
- 3D – opisuju konfiguraciju molekule – geometrijski,sterički i volumni deskriptori.

Topološki indeksi čine najveću skupinu teorijskih molekulskih deskriptora. Topološki je indeks numerička vrijednost interpretacije molekulskog grafa, a služi za povezivanje strukturnih karakteristika s djelovanjem, odnosno aktivnošću neke molekule. Molekulski graf predstavlja strukturu molekule, gdje atom odgovara verteksu(točki ili vrhu), a veza bridu(grani ili liniji) (Diudea i sur. 1999., Trinajstić 1993.).

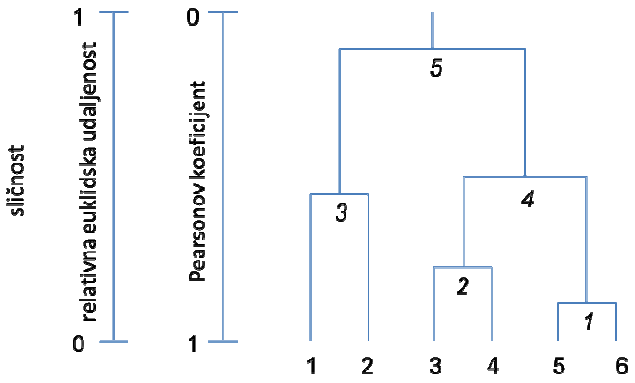
Osim jednostavnih deskriptora, temeljenih na prebrojavanju (npr. atoma u molekuli) i topoloških indeksa, koji se najčešće primjenjuju u modeliranju aktivnosti velikih kongeneričnih serija ili heterogenih skupova molekula, koriste se i sterički (van der Waalsovvolumen, površina), hidrofobni (Hanschova konstanta hidrofobnosti) i elektronski parametri (ukupna energija, E_{HOMO}, E_{LUMO}, dipolni moment, parcijalni naboj). Tako npr. log*P* opisuje lipofilnost molekule i njezin potencijal prolaza kroz stanične membrane (npr. krvno-moždanu barijeru). Molarnarefraktivnost opisuje potencijalne Londonove sile, broj donora i akceptora vodikove interakcije, a parcijalni naboji ionske interakcije s potencijalnom metom. Stoga se odabir molekulskih deskriptora temelji na njihovoj mogućnosti, odnosno jednostavnosti interpretacije. Skup molekulskih deskriptora, u idealnom slučaju, treba sadržavati one deskriptore koji ne nose istu informacijuikoji su slabo međusobno korelirani (Padrón i sur. 2002., Scior i sur. 2009.).

1.3.2. Strojno učenje bez učitelja. Dendrogrami i formiranje klastera

Strojno je učenje automatizacija procesa induktivnog učenja. Standardne metode strojnog učenja pokušavaju pronaći i opisati strukturne pravilnosti u podacima, a mogu biti klasifikacijske ili asocijacijske. U asocijacijskom učenju primjeri (u našem slučaju biološka varijabla) nisu klasificirani (učenje bez učitelja ili nenadzirano učenje), a cilj je postupka uočiti implicitne odnose koji postoje među podacima (molekulskim deskriptorima) (Han i

Kamber 2001.).U ovu skupinu analitičkih metoda svrstava se analizaglavnih komponenti (engl. *principal componentanalysis*, PCA), samoorganizirajuće mape (engl. *self-organizingmap*, SOM), metoda *k*-najbližih susjeda (engl. *k-nearest-neighbour*, KNN), formiranje dendrograma te analiza klastera i dr. Glavna prednost nenadziranog učenja je nepristranost algoritma u prilagođavanju zavisne varijable nezavisnoj,kao što jenpr. traženje korelacije (Livingstone 2009.).

Hijerarhijsko formiranje klastera ima za cilj grupiranje spojeva na temelju njihove sličnosti. Mjera sličnosti može biti euklidska udaljenost, Pearsonova korelacija, Manhattan udaljenost i dr. Spajanjem najbližih parova spojeva u klastere nastaje hijerarhijsko stablo ili dendrogram. Obično se pod pojmom analiza klasterapodrazumijeva aglomeracijska, hijerarhijska, jednopovezna tvorba klasteraprikazana naslici 4 (Kapetanović i sur. 2004.).*N* elemenata tvori *N*–1 klastera. Ukoliko je mjera sličnosti euklidska udaljenost, sličniji elementi imaju manju vrijednost euklidske udaljenosti. U slučaju da je mjera sličnosti Pearsonov koeficijent korelacije, sličniji elementi klastera imaju veće vrijednosti.



Slika 4. Dendrogramanalizeklastera.

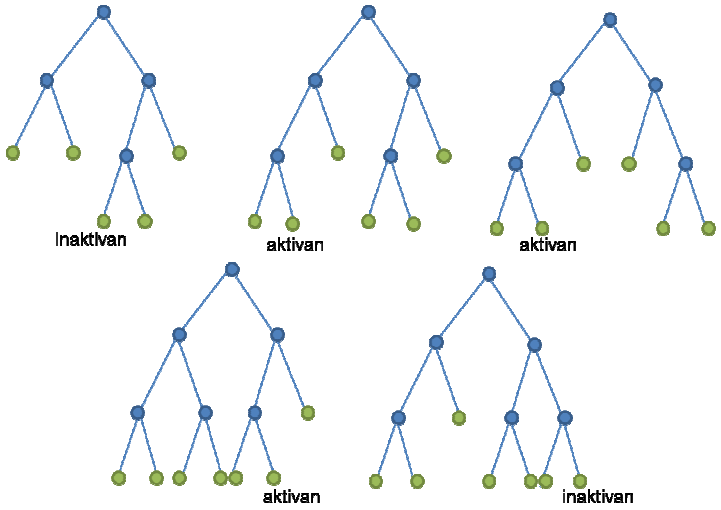
Problem u formiranju klastera predstavlja procjena značajnosti dobivenih klastera. McFarland i Gans (1987.) ponudili su rješenje problema analizom značajnostiklastera. Neka u skupu od *N* spojevaklaster aktivnihspojeva čini*M* elemenata. Tada je broj teorijskih klastera od *M* elemenata jednak $\binom{N}{M}$.Označimo li s *A* broj klastera iste ili jače povezanosti (npr. manje prosječne udaljenosti), vjerojatnost slučajnog pronalaženja klasteraod *M* elemenata iste ili jače povezanosti jednaka je: $p = A/\binom{N}{M}$.Ako u primjeru navedenom na slici 4,klaster aktivnih

spojeva čine spojevi 3 i 4, onda je teorijski broj klastera od dva elementa u skupu od 6 spojeva $\binom{6}{2}$. Dva su klastera (1 i 2) iste ili jače povezanosti te je vjerojatnost slučajnog pronalaženja klastera od *M* elemenata iste ili jače povezanosti jednaka p = 2 / 15 = 0,133. No, i sami autori koncepta daju prednost kombinatoričkom pristupu rješavanju problema na velikim skupovima podataka pred iscrpnim pretraživanjem svih uzoraka (Livingstone 2009.). Stoga je u ovom radu procjena značajnosti dobivenih klasteraprovedena višedimenzijskim ponovnim uzorkovanjem (engl. *multiscalebootstrapesampling*) (Shimodaira2004.). Neka se od skupa od *N*elementa (spojeva) generira *B* skupova s manjim, jednakim ili većim brojem elemenata. Od svakog generiranog skupa na temelju varijabli (molekulskih deskriptora), formira se hijerarhijsko stablo. Ukoliko su dva spoja povezana u isti klaster*k* puta, onda je jedna od mjera značajnosti klastera omjer k/B. Npr. ako dva spoja uvijek čine isti klaster ($k = B$) onda je stabilnost klastera 100%.

1.3.3. Strojno učenje s učiteljem. Slučajna šuma

U klasifikacijskom učenju, koristeći skup već klasificiranih primjera (učenje s učiteljem ili nadzirano učenje) algoritam pokušava naučiti način klasifikacije novih primjera, tj. konstruirati opis svake od klasa. U najjednostavnijem se slučaju koristi logistička regresija. No, u potrazi za najboljim modelom, regresijska analiza je inferiorna kada se provodi analiza velikog broja molekula i molekulskih deskriptora. U tako velikom skupu podataka mogućnost se pronalaženja slučajne korelacije povećava, te se prednost daje umjetnim neuronskim mrežama (engl. *artificialneuralnetworks*, ANN), genetskim algoritmima (engl. *geneticalgorithms*, GA), strojevimas potpornim vektorima (engl. *supportvectormachines*, SVM) i slučajnim šumama (engl. *randomforests*, RF)(Livingstone 2009.).

Slučajna je šuma metoda asocijacijskog statističkog učenja,zasnovana na tvorbi združenih stabala odluke, a konačno se predviđanje donosi metodom združivanja rezultata, odnosno većinskim glasovanjem u slučaju predviđanja klasa. Ova metoda u osnovi ima tehniku stabala odluke, koja se zasniva na izboru onih deskriptora i odgovarajućih graničnih vrijednosti za koje se postiže najtočnija klasifikacija objekata, u našem slučaju ispitivanih spojeva (slika 5).



Slika 5. Prikaz principa slučajne šume.

Za izgradnju slučajne šume dovoljno je definirati broj stabala odluke (u prikazanom primjeru 5), broj molekulskih deskriptora za formiranje grane (uobičajeno drugi korijen broja molekulskih deskriptora) i minimalnu veličinu terminalnog čvora (1). Konačna se odluka donosi većinom glasova.

Prednostje primjene metode slučajne šume točnostpredviđanja, koja je veća u odnosu navećinu drugih metoda (Breiman 2001.). Ova metoda omogućuje manipulaciju velikim skupovima podataka, te je brža i manje podložna prepodešavanju (engl. *overfitting*), što je čest slučaj s ANN. Relativno je robusna na bjegunce (engl. *outliers*) i šumove, a moguće je koristiti i nepotpune skupove podataka. Metodadaje i procjenu pogreške i korelacije. RF vrednuje molekulskedeskriptore, čime se omogućuje izbor relevantnih molekulskih deskriptora koji objašnjavaju postavljeni model. Jednostavna jetehnika za paralelizaciju, a algoritmi su lako primjenjivi jer korisnik,u najjednostavnijem slučaju, samo definira broj stabala i deskriptora koji će sudjelovati u rastu stabla. Nedostatci slučajne šume su nemogućnost izravne intepretacijei uvida u odabir kriterija vrednovanja te slabije modeliranje na manjim skupovima podataka (Breiman 2001., Svetnik i sur. 2003., Debeljak 2007.). Sve navedeno omogućilo je široku primjenu slučajne šume u QSAR i QSPR istraživanjima na području biomedicine (Biljani sur. 2012., Hsieh i sur. 2011., Palmer i sur. 2007., Svetnik i sur. 2003.).

1.4. Flavonoidi, agregacija trombocita i QSAR – literaturni pregled

Antiagregacijsko djelovanje flavonoida temelji se na inhibiciji aktivacije i agregacije trombocita, a može biti posljedica pojačane produkcije prostaciklina koji sintezom cikličkog adenozin-monofosfata (cAMP) smanjuju agregaciju trombocita (katehinsko-antocijanidinska frakcija dealkoholiziranog vina povećava razinu cAMP). Flavonoidi također mogu inhibirati fosfodiesterazu odgovornu za razgradnju cAMP. Isto tako mogu spriječiti adheziju leukocita i trombocita pojačavajući produkciju dušikova oksida (inhibicija agregacije trombocita s pojačanom produkcijom NO primijećena je kod dobrovoljaca koji su konzumirali sok grožđa). Ispitivano je i dokazanoda jesmanjenje agregacije trombocita*invitro* posljedica inhibicije aktivnosticiklooksigenaze,lipooksigenaze, tirozin-kinaze ifosfolipaze (Akhlaghi i Bandy 2009., Freedman i sur. 2001., Guerrero i sur. 2005., Leifert i Abeywardena 2008., Lill i sur. 2003., Nakahata 2008., Navarro-Núñezi sur. 2009.,Phang i sur. 2011.,Pignatellii sur. 2000., Pignatelli i sur. 2006.).Pregled mehanizama kojimaflavonoidi ostvaruju antiagregacijski učinak prikazan je u tablici 2. Podaci pokazuju raznolikost i nekonzistentnost učinka pojedinihflavonoida (npr. hesperetina) na agregaciju trombocita.

Istraživanjaantiagregacijskog učinka *invitro*pokazala suda flavonoidi iskazuju antiagregacijski učinak u mikromolarnim koncentracijama. Guerrero i sur. (2005.) su utvrdili daapigenin, dimetilapigenin, roifolin, luteolin, diosmetin, genistein, kvercetin, rutin ikatehin inhibiraju agregaciju trombocita u rasponu koncentracija (IC_{50}) 9,3–1000μMkoja je potaknuta kolagenom, 24,5–1000μMkoja je potaknuta arahidonskom kiselinom i 25–1000 μMkoja je potaknutatrombinom. Katehin, u koncentracijama od 50 do 100 μM, te kvercetin, u koncentracijama od 10 do 20 μM, inhibiraju agregacijutrombocita koja je potaknuta kolagenom,dok se u manjimkoncentracijama postiže sinergistički učinak (Pignatelli i sur. 2000., Bucki i sur. 2003.).

Antiagregacijski učinak polifenola dokazan je i *in vivo*. Citrusi i prehrambeni proizvodi na bazi citrusa, bogati naringeninom i hesperetinom, pokazuju negativnu korelaciju s rizikom od nastanka kardiovaskularnih bolesti. Naringenin aktivira receptore estrogena ERα i ERβ, dok hesperetin aktivira receptore estrogena ERα i potiče oslobađanje NO, koji u konačnici može djelovati antiagregacijski (Liu i sur. 2008.).Polagruto i sur. (2007.) su pokazali da ekstrakt grejpa, bogat flavonoidima, statistički značajno smanjujeagregacijutrombocita koja jepotaknuta ADP-om.

Tablica 2. Literaturni pregled utjecaja flavonoida na agregaciju trombocita.

Mehanizam djelovanja flavonoida	Utjecaj ispitanih flavonoida na agregaciju trombocita	Literatura
1 – promjena funkcije lipidnogdvosloja	↓ kvercetin, naringenin, hesperetin	Saija i sur. 1995.
2 – oksidativni stres	↓ epikatehin	Poletto i sur. 1996., Neiva i sur. 1999.
	↓ hesperetin	Hwang i Yen 2009.
	↔ hesperetin	Orallo i sur. 2004.
	↑ hesperetin (preko ksantin-oksidoreduktaze)	Dew i sur. 2005.
	↑ bajkalein, morin, miricetin, kvercetin, rutin	Chou i sur. 2007.
3 – intracelularna koncentracija kalcija	↓ hesperetin	Jin i sur. 2007., Hwang i Yen 2009.
	↓ 3,6-dihidroksiflavon	Ogunbayo i sur. 2008.
	↑ izoramnetin, izosakuranetin	Hwang i Yen 2009.
4 – inhibicija fosfolipaza C – PLCγ2	↓ kvercetin, apigenin, katehin, tamariksetin	Hubbard i sur. 2004., Wright i sur.
– Syk	↓ kvercetin, apigenin, katehin, tamariksetin	2010.
5 – inibicijacAMPfosfodiesteraza	↓ hesperetin (indirektno preko NO)	Liu i sur. 2008.
	↓ luteolin, kvercetin, apigenin (direktno)	Dell'Agli i sur. 2008.
6 – inhibicija ciklooksigenaza – COX1	↓ hesperetin, kvercetin	Jin i sur. 2007., Lee i Kim 2010.
– COX2	↓ luteolin, kemferol, hesperetin, naringenin	Lee i Kim 2010.
7 – inhibicija tromboksan A_2sintaza	↓ epikatehin	Vibes i sur. 1994.

Redni brojevi odgovaraju mjestima djelovanja na signalnim putovima prikazanim na slici 3.

Legenda utjecaja: ↓ – smanjuje, ↔ – ne utječe, ↑ – povećava.

Proučavajući utjecaj crvenog vina na agregaciju trombocita koja je potaknuta ADP-om i sintezu eikozanoida, Pace-Asciak i sur. (1995.) uočili su da *trans*-resveratrol i kvercetin za razliku od epikatehina, inhibiraju agregaciju zbog inhibicije sinteze tromboksana B_2.

Osim flavonoida i fenolne kiseline pokazuju antiagregacijski učinak što su pokazali Luceri i sur. (2007.) ispitujući *p*-kumarinsku kiselinu *invitro* i *in vivo*, no taj je učinak postignut u velikimkoncentracijama.

Sustavnim su pregledom (uključujući metaanalize) Tempfer i sur. (2007.) zaključili da niti jednom od ispitivanih fitoestrogena (izoflavonoidi) nije dokazano protektivno djelovanje u sprječavanju raka dojke, loma kostiju ili kardiovaskularnih bolesti. Suprotno tome, novije istraživanje na velikom je uzorku populacije pokazalo da hrana bogata izoflavonoidima (leguminoze, soja, tofu) štiti od raka endometrija (Ollberding i sur. 2012.). Dvojbe postoje i u *invitro* istraživanjima. Tako su, Neiva i sur. (1999.) utvrdili da epikatehin ipak inhibira agregacijukoja je potaknuta ADP-om, arahidonskom kiselinom i noradrenalinom, te smanjuje produkciju malonaldehida.Istraživanja de Langa i sur. (2007.)pokazalasu da epikatehin inhibira agregacijutrombocita tek u koncentracijama većim od 160 µM. U *ex vivo*istraživanjima utjecaja kakaa na agregaciju trombocita, pokazano je da katehini inhibiraju agregacijukoja je potaknuta ADP-om i adrenalinom (Pearson i sur. 2005.), dokepikatehin taj učinak postiže istim mehanizmom kao i acetilsalicilna kiselina kada je agregacija potaknuta arahidonskom kiselinom ili kolagenom (Heptinstall i sur. 2006.).

Mišljenja znanstvenika ostaju podijeljena jer izvori polifenola predstavljaju kompleksne smjese većeg broja polifenola, te je djelovanje vjerojatno posljedica sinergističkog učinka (Janssen i sur. 1998., Violi i sur. 2002.).

Prema dostupnim podacima iz literature, sustavno QSAR istraživanje odnosa strukture polifenola i antiagregacijskog učinka nije provedeno. Sustavno SAR ispitivanje predstavlja nedavno objavljeni rad Navarro-Núñez i sur. (2009.) kojim su pokazali kako male promjene na strukturi utječu na jedan segment antitrombocitnog učinka flavonoida. Naime, dolazi do kompetitivne inhibicije SQ29548, antagonista receptora tromboksana A_2. SAR istraživanja na manjim uzorcima provedena su na nizu heterogenih spojeva izoliranih iz *Zingiberaceae* vrsta i prenilflavonoida izoliranih iz *Artocarpuscommunis* (Jantan i sur. 2008., Weng i sur. 2006.). Sličnu su QSAR analizu planiranu u našim istraživanjima napravili Roma i sur. (2003.) na novosintetiziranim bicikličkim i tricikličkim derivatima kumarina, kromona i 4(3H)-pirimidinona.

U razvijenim zemljama najčešćisuuzrok smrtnosti kardiovaskularne bolesti. Trombociti su uključeni u hemostazu, trombozu i upalne procese, a kardiovaskularne bolesti mogu biti upravo posljedica patološke aktivacije trombocita. Najčešće primjenjivani lijek u prevenciji kardiovaskularnih bolesti je acetilsalicilna kiselina, no zbog brojnih ozbiljnih nuspojava, pa i smrtnih ishoda, velika sepažnja posvećuje istraživanju lijekova koji će inhibirati agregaciju trombocita na sigurniji način. Rezultat jetakvih istraživanja i klopidogrel, sintetički lijek koji svoje djelovanje temelji na inhibiciji receptora adenozin-difosfata, koji također pokazuje rjeđe, ali ozbiljne nuspojave poput trombotične trombocitopenične purpure. Od izoliranih prirodnih spojeva takvo djelovanje pokazuju polifenoli, prvenstveno flavonoidi i prirodni izvori bogati polifenolima, kao što su vino (francuski paradoks), zeleni čaj (azijski paradoks), tamna čokolada, gingko i propolis.

Osim znanstvenog doprinosa, istraživanje antiagregacijskog djelovanja potencijalnih novih farmakološki aktivnih spojeva, nosi i društvenu, odnosno ekonomsku opravdanost. Prevalencija kardiovaskularnih bolesti (hipertenzija, koronarne srčane bolesti, infarkt miokarda i moždani udar) u SAD-u godine 2010. iznosila je 37%, rezultirajući s 272 milijarde dolara direktnih i 172 milijardedolara indirektnih troškova(Heidenreich i sur. 2011.). I u Europskoj seuniji ovaj problem shvaća ozbiljno jer se očekuje povećanje troškova od 40% za liječenje ovih bolesti i njihovih posljedica u sljedećih dvadeset godina.

Temeljna *in vitro*istraživanja ukazuju na opravdanu primjenu polifenola u sprječavanju kardiovaskularnih bolesti. Klinička suistraživanja utjecaja flavonoida na antiagregacijski učinak opisana u brojnim radovima, no rezultati su dvojbeni. Većina radova u kojima su opisana*in vitro*istraživanja, koristi plazmubogatu trombocitima iograničen broj flavonoida. Stoga je nužno provesti opsežnije i pouzdanije *in vitro*probiranje flavonoidana antiagregacijski učinak, a poželjno je i postavljanje odgovarajućeg QSAR modela koji bi dao jasniji uvid u farmakološke determinante takvog učinka. Takvo ćeistraživanje doprinijeti razumijevanju mehanizma djelovanja flavonoida i njima bogatih prirodnih izvora, kao što su propolis i vino.

U ovoj će se disertaciji provesti različiti *in vitro* testovi agregacije trombocita koja je potaknuta različitim agonistima agregacije (ADP, arahidonska kiselina, kolagen, ristocetin i TRAP-6). Mjerenja će se provesti impedancijskom metodom u punoj krvi. Predložena ćeistraživanja omogućiti izbor najboljihflavonoida antiagregacijskog učinkai procjenu utjecaja dnevnog unosa flavonoida na *in vivo* agregaciju trombocita.

3.1. Materijali

Standardi flavonoida i priprema radnih otopina

Određivanje antiagregacijskog učinka, u testu agregacije trombocitakoja je potaknuta ADP-om,provedeno je na 30 standardnihflavonoida:

- akacetin, homoeriodiktiol, izoramnetin, izosakuranetin, ramnetin, siringetin, tangeretin (BioChemika,Švicarska)
- apigenin, krizin, flavon, kvercetindihidrat (Fluka, Njemačka)
- krizin-dimetileter, daidzein, diosmetin, fisetin, formononetin, genistein, luteolin, pinocembrin, pinocembrin-7-metileter, prunetin, tektokrizin (Extrasynthese, Francuska)
- epikatehin, galangin, hesperetin (Sigma-Aldrich, Švicarska)
- 3-hidroksiflavon, 6-hidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, 3,6-dihidroksiflavon i 3,7-dihidroksiflavon (ChromaDex, SAD).

Klopidogrel (HALMED, Hrvatska) je u ovom testu korišten kao pozitivna kontrola.

Određivanje mehanizma antiagregacijskog i proagregacijskog učinka provedeno je na 5 flavonoida: pinocembrin-7-metileter, epikatehin, hesperetin, 6-hidroksiflavoni 3,6-dihidroksiflavon.

Za odvagu ~ 1 mg flavonoida, ovisno o molarnoj masi flavonoida, korištena je laboratorijska vagaMettler-Toledo AB135-S/FACT(Mettler-Toledo, Inc., SAD). Radne otopine flavonoida priređene su otapanjem i razrjeđivanjem flavonoida u dimetilsulfoksidu (DMSO; Sigma-Aldrich, Švicarska).Korišten je koncentracijski raspon od 15,1 mM do0,0001mM ovisno o pojedinom flavonoidu, što odgovara konačnim koncentracijama od 488µM do 0,030 µM u punoj krvi.

Uzorci krvi

Uzorci svježe citratne krvi zdravih dobrovoljaca sakupljeni su u vakuum epruvete od 4,5 mL(Vacutainer BD, SAD). U istraživanju za procjenu antiagregacijskog učinka flavonoidasudjelovalo je 150 ispitanika i 10 dobrovoljnih ispitanika za procjenu normalne raspodjele rezultata agregacijskog testa u zdravoj populaciji. Svi suispitanici dali pisani

pristanak za sudjelovanje u istraživanju (prilog B). Ovaj je rad odobren od etičkih povjerenstava Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te je proveden u skladu s Helsinškom deklaracijom.

Kemikalije i instrumentacija za određivanje agregacije trombocita

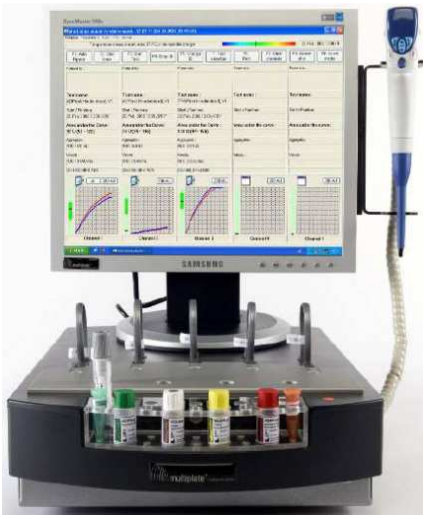
Korišteni su sljedeći induktori agregacije (Dynabyte, Njemačka):

- 0,2 mM ADP (ATPtest)
- 100 μg/mL kolagen (COLtest)
- 1 mM TRAP-6 (TRAPtest)
- 15 mM arahidonska kiselina (ASPItest)
- 10 mg/mL ristocetin (RISTOtest).

Korištenesu fiziološke otopinepripremljenestandardiziranim postupcima u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska:

- fiziološka otopina natrijeva klorida (0,9% NaCl)
- fiziološka otopina s kalcijevim kloridom (0,003 M $CaCl_2$ u 0,9% NaCl).

Određivanje agregacijeprovedeno je mjerenjem impedancije u kivetama s dvostrukim parom srebrenih elektroda na Multiplate® uređaju (Dynabyte, Njemačka; slika 6).



Slika 6. Multiplate® uređaj za praćenje agregacije trombocita.

Programski paketi korišteni za statističku obradu podataka i QSAR modeliranje

Optimizacija molekulske geometrije provedena je u evaluacijskoj verziji HyperChema 8.0 (Hypercube, SAD). Molekulski su deskriptori generirani u MOPAC 7 (Stewart ComputationalChemistry, SAD) i ACD/ChemSketch (Freeware)11.0 (AdvancedChemistryDevelopment, Kanada) paketima.

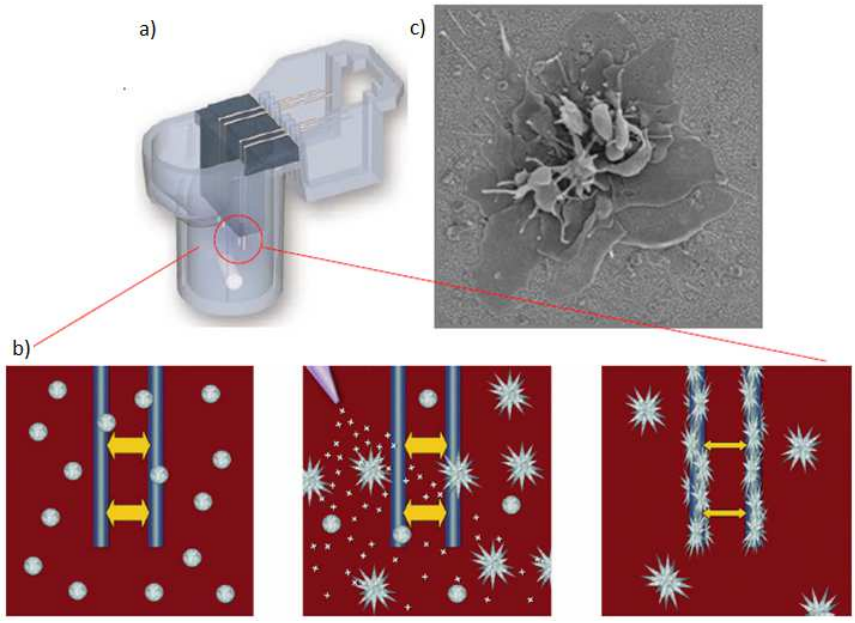
Globalni su deskriptori preuzeti s mrežnih aplikacija*chemspider.com* (Royal SocietyofChemistry, UK) i *chemicalize.org* (ChemAxon, SAD) posredstvom ACD/ChemSketch (Freeware)11.0 programa.

Statistička obrada podataka, predviđanje metodom slučajne šume (RF) i eksterna validacija (LOO) provedene su uprogramu R v2.8.1 (R Foundation, Austrija).

3.2. Metode

3.2.1. Impedancijska agregometrija

Određivanje agregacije trombocita provedeno je impedancijskom metodom u punoj krvi (slika 7). Mjerenje se provodi u kiveti (slika 7-a) s dva nezavisna para elektroda što osigurava kvalitetu mjerenja. Impedancijska se agregometrija bazira na činjenici da trombociti u mirovanju nemaju sklonost stvaranja ugruška, no ukoliko dođe do aktivacije, trombociti se pričvršćuju u fiziološkim uvjetima na krvnu žilu, a u laboratorijskom testu na umjetnu površinu odnosno elektrodu (slika 7-b). Pri tome jača električni otpor koji se snima, te se rezultat iskazuje kao površina ispod krivulje(Calatzis i sur. 2006.). Slika 7-c snimljena elektronskim mikroskopom predstavlja agregaciju trombocita na Multiplate® uređaju.



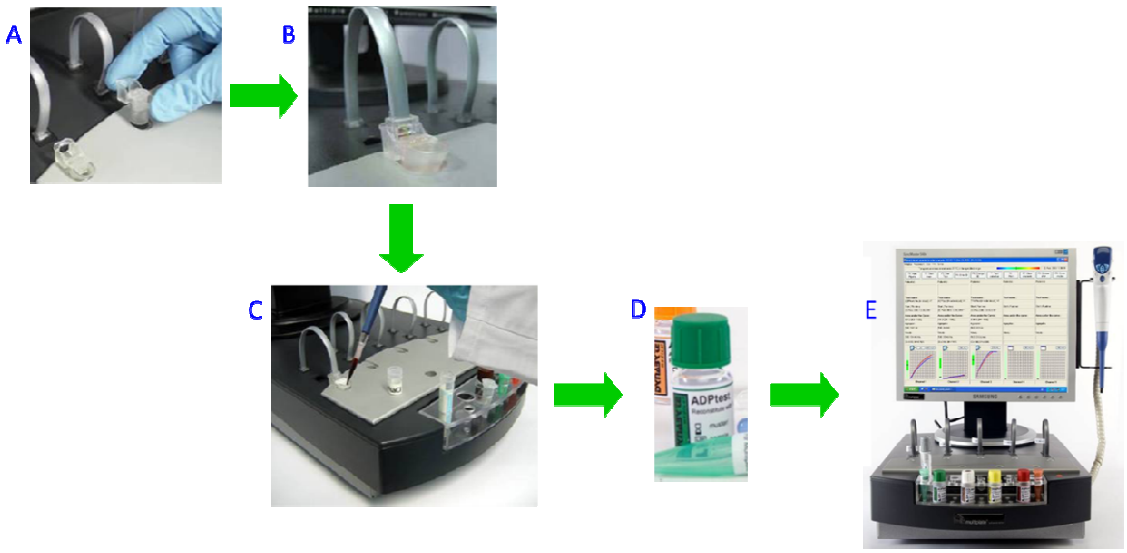
Slika 7. Princip impedancijske agregometrije.

Prednosti su ove metode jednostavnost i brzina. Dodatna obrada krvi nije potrebna, za razliku od optičke agregometrije gdje se od pune krvi priprema plazma bogata trombocitima.Metoda se može provoditi s različitim induktorima agregacije (ADP, kolagen, ristocetin, TRAP-6, arahidonska kiselina), a koriste se male količine krvi (Calatzis i sur. 2006., Calatzis2007.).

3.2.2. Određivanje minimalne antiagregacijske koncentracije

Provedba testa agregacije trombocita

Agregacijaje trombocita analizirana na Multiplate® uređaju. Korištena je generička procedura proizvođača instrumenta: 300 µLkrvi inkubirano je tijekom 6 minuta s 20 µLotopine flavonoidai 300 µLfiziološke otopine s$CaCl_2$(ASPItest i RISTOtest) ili bez$CaCl_2$(ADPtest, COLtest i TRAPtest)na temperaturi od 37 ˚C. Za negativnu je kontrolu korišteno otapalo – DMSO (konačna koncentracijaDMSO-a 3%-tna). Agregacijskaje kaskada potaknuta dodatkom 20 µLreagensa s odabranim agonistomagregacije. Konačna jekoncentracija induktora agregacije u pojedinim testovima bila: 6,3 µM ADP; 3,1 µg/mL kolagen; 31 µMTRAP-6; 0,48 µMarahidonska kiselina odnosno 0,3 mg/mL ristocetin. Agregacija je mjerena tijekom 6 minuta i izražena je kao površina ispod krivulje u arbitrarnim jedinicama. Provedba je agregacijskog testa ilustrirana na slici 8.



Slika 8. Provedba agregacijskog testa.A –postavljanje kiveta s magnetskim mješačem u inkubacijski blok Multiplate® analizatora, B –spajanje mjernih elektroda na instrument, C – dodavanje krvi i reagensa, D –inicijacija agregacije dodatkom induktora, E –iskazivanje rezultata (površina ispod krivulje).

Ukoliko je uočen antiagregacijski učinak, rezultat je iskazan u obliku minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida (*MINaAC*).U protivnom,proagregacijskije učinak

zabilježen. *MINaAC*je najmanja koncentracija flavonoida koja statistički značajno smanjuje agregaciju u odnosu na negativnu kontrolu istog ispitanika.

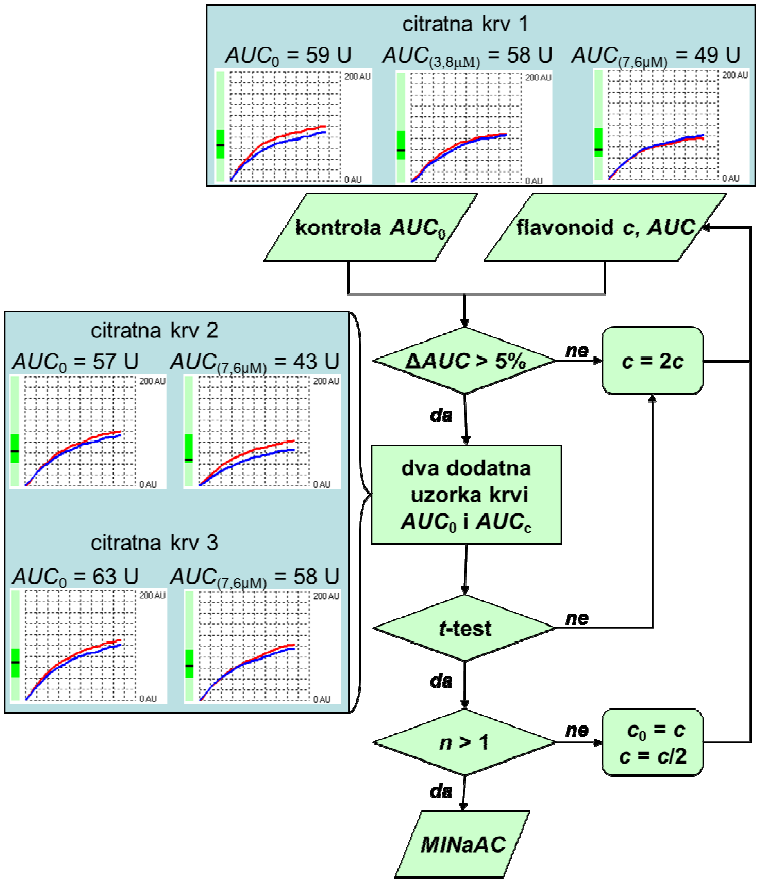
Postupak određivanja minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida

Prvo je potrebno izmjeriti agregaciju kontrolnog uzorka (bez dodatka flavonoida, AUC_0) i uzorka flavonoida (*AUC*). Ukoliko je razlika agregacija veća od 5%, potrebno je napraviti dva dodatna mjerenja na novim uzorcima citratne krvi. U suprotnom, koncentracija se flavonoida udvostruči, a prvi se korak ponovi. Ako flavonoid u analiziranoj koncentraciji pokazuje statistički značajno smanjenje agregacije trombocita,u odnosu na kontrolni uzorak,[1] tada analizirana koncentracija odgovara minimalnoj antiagregacijskoj koncentraciji (*MINaAC*). Ukoliko ne postoji statistički značajna razlika, koncentracija se flavonoida udvostručuje i analiza se ponavlja od prvog koraka. Prethodno navedeno vrijedi, ukoliko analizirana koncentracija nije prva analizirana (n > 1) jer analizu treba ponoviti od početka, uz dvostruko manju koncentraciju flavonoida.

Postupak je slikovito prikazan na primjeru prunetina (slika 9). Razlika agregacija analizirane koncentracije prunetina(3,8 μM) u odnosu na kontrolnu nije veća od 5% (58 U vs. 59 U). Stoga se provodi dodatno mjerenje s dvostrukom koncentracijom prunetina (7,6 μM). Kako je razlika u agregaciji sada veća od 5% (ΔAUC = 17%) mjeri se agregacijatrombocita s većom koncentracijom prunetina(7,6 μM) na dva nova uzorka citratne krvi. Analizirana koncentracija prunetina statistički značajno smanjuje agregaciju u odnosu na kontrolni uzorak (p = 0,033) te je *MINaAC* = 7,6 μM.

Statistička je analiza provedena primjenom Studentova *t*-testa u programu R. Normalna je raspodjela agregacije na 10 zdravih dobrovoljaca testirana Shapiro-Wilk testom (p = 0,501).

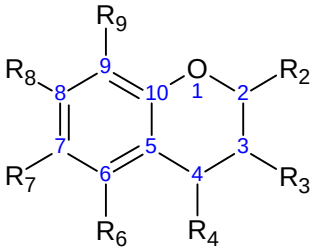
[1] Hipoteza o nepostojanju razlike (H_0) je testirana Studentovim *t*-testom za parne (zavisne) podatke: 3 mjerenja kontrolnih uzoraka i uparenih mjerenja na uzorcima krvi s dodatkom flavonoida. Kako je riječ o smanjenju agregacije odabran je jednosmjerni t-test. Ukoliko je $p<\alpha$ (0,05) hipoteza H_0 se odbacuje.



Slika 9. Slikoviti prikaz određivanja minimalne antiagregacijske koncentracije flavonoida (*MINaAC*). Plava i crvena linija na slici označavaju dva paralelna mjerenja istog uzorka. Ukoliko je razlika između dva mjerenja veća od 10% upozorenje o kvaliteti mjerenja je istaknuto i mjerenje treba ponoviti.

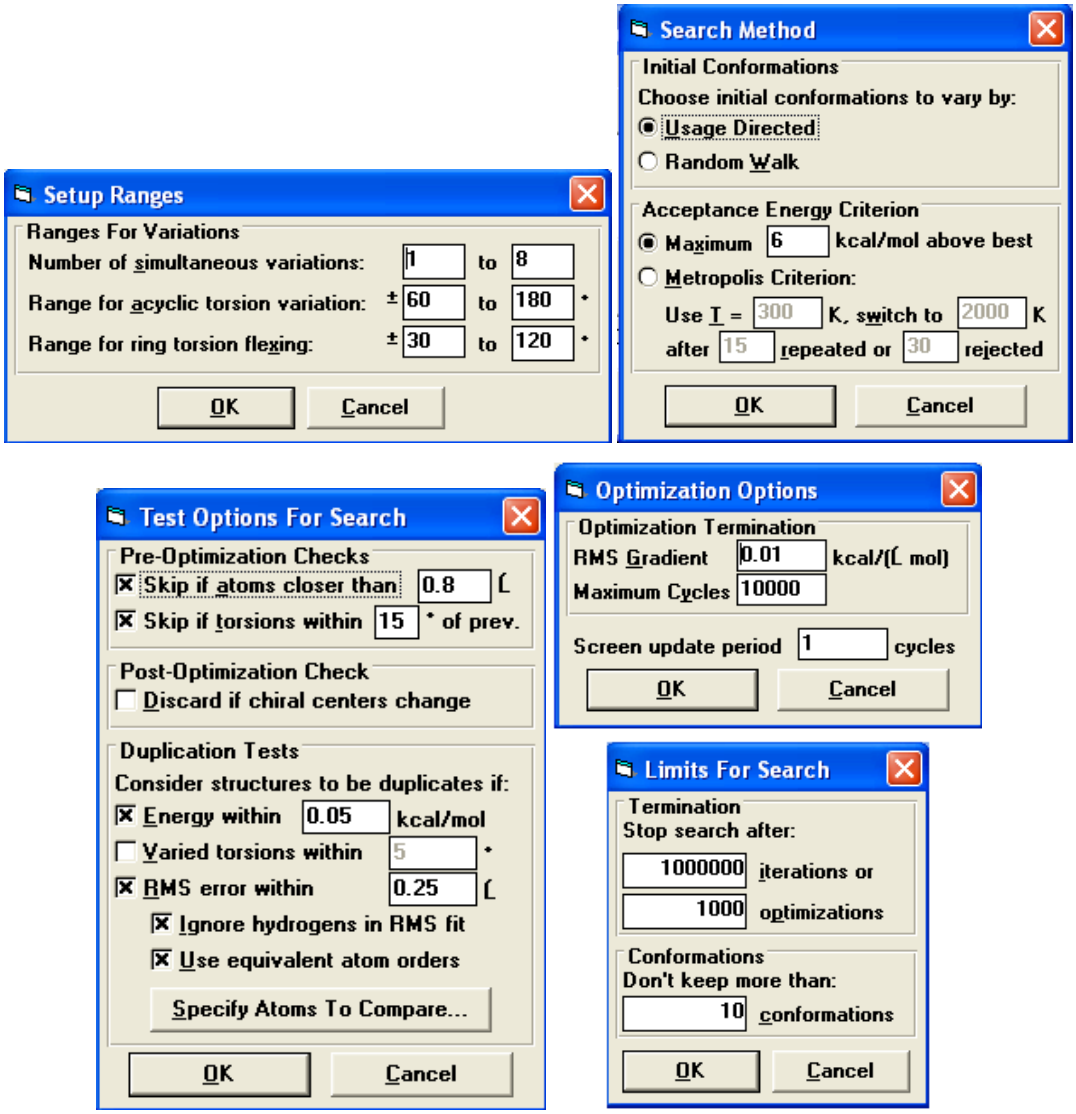
3.2.3. Molekulski deskriptori

Na osnovi nacrtane strukture flavonoida (slika 10) u programu ACD/ChemSketchgenerirani su deskriptori supstituenata: volumen (V_s), masa (M_s) i hidrofobna konstanta po Hanschu (π_s).



Slika 10. Osnovni kostur flavonoida korišten za računalne proračune s naznačenim supstituentima R_2, R_3, R_4, R_6, R_7, R_8 i R_9.

Pretraživanje konformacijskog prostora u potrazi za energetski najpovoljnijim energetskim stanjem ispitivanogflavonoida,provedeno je u programu HyperChem. Inicijalna je geometrijaodređena molekulsko-mehaničkim metodama. Konformacije su generirane Monte Carlo algoritmom, a geometrija je optimirana primjenom semiempirijske AM1 metode. Torzijski je kut postavljen između atoma 3–2–11–12, a limiti pretraživanja na 1000000 iteracija i 1000 optimizacija. Ostale automatske postavke proračuna nisu mijenjane, a navedene su na slici 11.



Slika 11. Postavke konformacijskog pretraživanja u HyperChem-u.

Energetski najpovoljnija konformacija u *zmt*-formatu korištena je za izračune u MOPAC-u uz ključne riječi AM1 te *charge*=0, *pmep*, *minmep*, *qpmep*, *bonds*i*xyz*. Iz MOPAC-a su preuzeti sljedeći deskriptori: ukupna energija (E_T), energija najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO}), energija najniže slobodne molekulske orbitale (E_{LUMO}), COSMO površina (COSMO-A) i volumen (COSMO-V), dipolni moment (μ), parcijalni (PC) naboji atoma i supstituenata, red veze (BO) i duljina veze (ID).

Predviđene vrijednosti fizikalno-kemijskih parametra: log*P* (logP_{ACD}), gustoća (ρ), površinska napetost (η), temperatura plamišta (T_F), entalpija isparavanja (ΔH_v), temperatura vrelišta (T_B) i tlak para (p_V), preuzete su iz ACD/Labs-a, topljivost (*s*) iz EPI Suit-a (*chemspider.com*), a izoelektrična točka (p*I*) i log*P* (logP_{chem}) s *chemicalize.org* i *chemspider.com* mrežnih aplikacija.

Svi su ostali globalni deskriptori[2] preko poveznice u ACD/ChemSketchu preuzeti iz mrežne aplikacije *chemicalize.org*, a uključuju: 0D i 1D-deskriptore, deskriptore vodikove veze, indekse fleksibilnosti, hidrofobne, geometrijske i steričkeparametre,elektronske i kvantno-kemijskedeskriptorete topološke indekse (tablica 3). U nastavku su navedene definicije i značajke pojedinih molekulskih deskriptora te pripadajući literaturni izvori po kojima se molekulski deskriptori izračunavaju.

0D i 1D-deskriptori, deskriptori vodikove veze, indeksi fleksibilnosti

Molekulski deskriptori kojim se prebrojavaju pojedini atomi, veze, funkcionalne skupine i prstenovi u strukturi predstavljaju jednostavne 0D i 1D-deskriptore. Mogu služiti kao binarne varijable – indikatori prisustva strukturnih značajki. Uključuju: broj asimetričnih atoma (AAC), broj atoma izvan prstena (ACAC), broj atoma u alifatskim vezama (AlAC), broj alifatskih veza (AlBC), broj zasićenih prstena (AlRC), broj atoma u aromatskim vezama (ArAC), broj aromatskih prstena (ArRC), broj aromatskih veza (ArBC), broj atoma u lancu (CAC), broj aromatskih prstena s ugljikovim kosturom (CARC), broj veza u lancu (CBC), ciklomatski broj (CN), broj prstena s ugljikovim kosturom (CRC), broj fuzioniranih zasićenih prstena (FAlRC), broj fuzioniranih aromatskih prstena (FArRC), broj fuzioniranih prstena

[2]Za modeliranje su odabrani globalni molekulski deskriptori i predviđeni fizikalno-kemijski parametari dostupni na *chemicalize.org*. Riječ je o nekomercijalnom softveru na kojem se generiranje provodi na temelju molekulske strukture. Pri tome se za proračune koriste minimalni vlastiti resursi (pristup internetu), a rezultati su lako dostupni.

(FRC), broj aromatskih heterocikala (HARC), broj heterocikala (HRC), veličina najvećeg prstena (LRS), broj atoma (NA), broj veza (NB),broj atoma u prstenima (RAC), broj veza u prstenima (RBC),broj prstena (RC), broj rotirajućih veza (RoBC), veličina najmanjeg prstena (SRS) (Downs i sur. 1989., Todeschini i Consonni 2000.).

Broj akceptora i donora vodikove veze predstavlja potencijal molekule za stvaranje vodikovih veza. HBA označava broj akceptorskih skupina, a jednak je broju sparenih elektrona kisika i dušika koji ne sudjeluju u kovalentnoj vezi. HBD označava broj donorskih skupina, a jednak je broju vodikovih atoma vezanih na kisik i dušik. Intermolekulskesu vodikove veze važne za interakcije između liganda i receptora, dok intramolekulske interakcije i interakcije između istovjetnih molekula utječu na fizikalno-kemijska svojstva, npr. molarnurefraktivnost, površinsku napetost, talište, vrelište i dr. (Kubinyi 2004.).

Broj veza u molekuli koje mogu rotirati oko vlastite osi (B_{FR}) je mjera fleksibilnosti, odnosno rigidnosti molekule. U B_{FR} nisu ubrojene veze u prstenima, aromatske, dvostruke i trostruke veze (Todeschini i Consonni 2000.).

Hidrofobni molekulski deskriptori

Logaritam koeficijenta razdijeljenja je logaritam koeficijenta raspodjele supstancije u organskom otapalu (oktanol) i puferu (voda): $logP = log\frac{c_{\text{oktanol}}}{c_{\text{voda}}}$. Predstavlja mjeru lipofilnosti i potencijal prolaza kroz membrane. Dva najčešće korištena pristupa u određivanju vrijednosti ovih parametara su Hanschova i Rekkerova metoda. Obje su metode aditivne, a rezultat se temelji na eksperimentalno određenim konstantama atoma (π) i fragmenata (f) (Viswanadhan i sur. 1989.).

Geometrijski i sterički molekulski deskriptori

Polarna je površina dio molekulske površine povezane s polarnim atomima, uobičajeno kisika i dušika, te pripadajućim atomima vodika. Topološki PSA (TPSA) je 2D deskriptor koji se izračunava na temelju fragmentarnih doprinosa. Mjera je pasivnog transporta molekule kroz membrane (Ertl i sur. 2000.).

Površina molekule dostupna otapalu (enlg. *solvent-accessiblesurfacearea*, SASA), kao što naziv sugerira, je površina dijelova molekule koji mogu stupiti u interakcije s otapalom, a obično je veća od van der Waalsove molekulske površine (Ferrara i sur. 2002.). S COSMO-A i COMSO-V označeni su površina i volumen dostupni otapalu, a izračunati prema COSMO modelu (engl.*conductor-likescreening model*) (Klamt i Schüürmann 1993.).

Relativna je molekulska masa jednostavan molekulski deskriptor koji opisuje veličinu molekule, a jednak je sumirelativnih atomskih masa: $M_r = \sum_i A_{r,i}$.

Dreidingova energija (E_D) predstavlja ukupnu energiju najstabilnijeg konformera predviđenu prema metodi Dreidingovih polja sila. Tom je konformeru određen van der Waalsov volumen (V_W), minimalna (A_{min}) i maksimalna (A_{max}) projekcijska površina i pripadajuće *z*-vrijednosti (z_{min}, z_{max}). Van der Waalsov volumen predstavlja unutarnji volumen prostora omeđen van der Waalsovommolekulskom površinom, izračunan na osnovi duljina veza, kutova među vezama i polumjera atoma (Mayo i sur. 1990.).

Elektronski i kvantno-kemijski molekulski deskriptori

Molarnarefraktivnost je definirana Lorenz-Lorentzovom jednadžbom $MR = \frac{n^2-1}{n^2+2} \cdot \frac{M_w}{\rho}$ gdje je *n* indeks loma (omjer brzina svjetlosti u vakuumu i tvari), M_w molekulska masa, a ρ gustoća. Omjer molarne mase i gustoće je molarni volumen (V_M). Ova vrsta deskriptora opisuje volumen molekule i moguće Londonove interakcije liganda s receptorom (Viswanadhan i sur. 1989.).

Dipolni je moment vektor usmjeren od negativnog prema pozitivnom naboju u molekuli. Definiran je izrazom $\mu = \sum_i q_i r_i$ gdje je q_i točkasti naboj na položaju r_i. Kada se molekula nađe u električnom polju E_0 u vakuumu se inducira dipolni moment $\mu_{ind} = \alpha E_0$, gdje je αpolarizabilnost. Molarnaje polarizabilnost inducirani dipolni moment po jedinici volumena, a definiran je izrazom: $P_M = \frac{\varepsilon-1}{\varepsilon+2} \cdot \frac{M_w}{\rho} = \frac{4\pi}{3} N_A \alpha E$. Ovi deskriptori opisuju polarne interakcije tj. interakcije s otapalom, odnosno medijem (Miller i Savchik 1979.).

Prema DFT (engl. *densityfunctiontheory*) elektronska gustoća $\varrho(r)$ u točki *r* predstavlja sumu elektronskih funkcija (atomskih orbitala): $\varrho(r) = \sum_\mu \sum_\nu P_{\mu\nu} \cdot \phi_\mu(r) \cdot \phi_\nu(r)$, gdje su $P_{\mu\nu} = \sum_i^N n_i \cdot c_{\mu i} \cdot c_{\nu i}$ redovi veze (BO), $P_{\mu\mu} = \sum_i^N n_i \cdot c_{\mu i}^2 = q_\mu$ parcijalni atomski naboj

(PC), *N* broj zauzetih molekulskih orbitala, a *n* broj elektrona u orbitali (1 ili 2) (Mulliken 1934.).

Orbitalna je elektronegativnost atoma u molekuli aritmetička sredina ionizacijskog potencijala (*IP*) i elektronskog afiniteta (*EA*), a ovisna je o parcijalnom naboju (*q*): $\chi_v = \frac{IP+EA}{2} = a + bq + cq^2$ gdje su *a*, *b* i *c* konstante. Ionizacijski je potencijal (*IP*) definiran kao energija potrebna da bi se oslobodio elektron iz kemijskog sustava. Elektronski je afinitet (*EA*) energija dobivena primanjem elektrona u kemijski sustav.

Ukupna je energija molekule (E_T) korištena u pretraživanju najpovoljnijih konformacija. Energija najviše popunjene molekulske orbitale (E_{HOMO}) je mjera nukleofilnosti, odnosno mogućnosti doniranja elektrona za nastajanje kemijske veze (mjera *IP*). Energija najniže slobodne molekulske orbitale (E_{LUMO}) predstavlja energiju najnižeg nivoa (orbitale) koja ne sadrži elektrone. Što je E_{LUMO}manji to je molekula sklonija primiti elektrone (mjera *EA*) (Gasteiger i Marsili 1980.).

Hückleova energija molekulskih orbitala uzima u obzir samo π-elektrone, te je ukupna energija označena s E_π (Isaacs 1987.).

Topološki indeksi

Topološki jeindeks numerička vrijednost interpretacije molekulskog grafa, a služi za povezivanje strukturnih karakteristika molekule s njezinom aktivnošću. U teoriji grafa molekulski graf predstavlja strukturu molekule gdje atom odgovara verteksu, točki ili vrhu, a veza bridu, grani ili liniji (Trinajstić 1993.).

Plattov je indeks definiran kao suma valencija molekulskog grafa: $F(\mathrm{G}) = 2\sum_i^n \binom{v_i}{2}$ gdje je *n* broj vrhova, a v_i valencija vrha *i* (Platt 1947.).

Randićev indeks predstavlja harmoniziranu sumu geometrijskih sredina valencija vrhova svakog brida: $\chi(\mathrm{G}) = \sum_i^n \left(v_{i,1}v_{i,2}\right)^{-1/2}$ gdje je *n* broj bridova, a $v_{i,1}$ i $v_{i,2}$ susjedni vrhovi uz brid *i* (Randić 1975.).

Balabanov indeks predstavlja Randićev indeks primijenjen na sumi udaljenosti (vrijednosti koja odgovara sumi reda u matrici udaljenosti): $J(\mathrm{G}) = \frac{N}{CN+1}\sum_i^n \left(DS_{i,1}DS_{i,2}\right)^{-1/2}$ gdje je *N*broj

vrhova, *CN*ciklomatski broj, *n* broj bridova, a $DS_{i,1}$ i $DS_{i,2}$ sume udaljenosti susjednih vrhova uz brid *i* (Balaban 1982.).

Hararyjev indeks: polovica sume recipročnih vrijednosti nedijagonalnih elemenata matrice udaljenosti: $H(\mathrm{G}) = \frac{1}{2}\sum_{i,j}^{n}\left(D_{i,j}\right)^{-1/2}$ gdje je *n* broj vrhova, a $D_{i,j}$ najkraća udaljenost između vrhova *ij* (Plavšić i sur. 1993.).

Wienerov indeks: polovica sume elemenata matrice udaljenosti: $W(\mathrm{G}) = \frac{1}{2}\sum_{i,j}^{n} D_{i,j}$gdje je *n* broj vrhova, a $D_{i,j}$ najkraća udaljenost između vrhova *ij* (Wiener 1947.).

Hiper-Wienerov indeks je varijacija Wienerova indeksa, a predstavlja kombiniranu matricu udaljenosti gdje udaljenost dvaju vrhova uključuje sumu svih međusobnih udaljenosti vrhova *ij* bez ponavljanja: $WW(\mathrm{G}) = \sum_{i=1}^{n}\sum_{i=j}^{n}\sum_{k=1}^{j} D_{i,j}$(Randić 1993.).

Wienerov indeks polarnosti predstavlja broj pojavljivanja udaljenosti od 3 brida između vrhova *ij*: $W_p(\mathrm{G}) = \#\left\{\{i,j\}\middle| D_{i,j} = 3, i,j \in N\right\}$(Deng i Xiao 2010.).

Szeged-indeks je proširena varijanta Wienerova indeksa za cikličke grafove, a definiran je izrazom: $Sz(\mathrm{G}) = \sum_{e=1}^{N} n_{1,e}(\mathrm{G})n_{2,e}(\mathrm{G})$gdje je *N* broj bridova, a $n_{1,e}$ odnosno $n_{2,e}$ broj elemenata skupa prema izrazu: $n_{1,e} = \#\{v|v \in V(\mathrm{G}), d_{v,i} < d_{v,j}\}$ i $n_{1,e} = \#\{v|v \in V(\mathrm{G}), d_{v,j} < d_{v,i}\}$ pri čemu je *v*verteks iz skupa vrhova grafa *V*(G) (Gutman 1994.).

Tablica 3. Pregled molekulskih deskriptora koji su korišteni za računalno simuliranje antiagregacijskog učinka flavonoida.

Simbol	**Molekulski deskriptor**
AAC	broj asimetričnih atoma
ACAC	broj atoma izvan prstena
AlAC	broj atoma u alifatskim vezama
AlBC	broj alifatskih veza
AlRC	broj zasićenih prstena
A_{max}	maksimalna projekcijska površina
A_{min}	minimalna projekcijska površina
ArAC	broj atoma u aromatskim vezama
ArBC	broj aromatskih veza
ArRC	broj aromatskih prstena
B_{FR}	broj veza u molekuli koje mogu rotirati oko vlastite osi
BO	red veze
CAC	broj atoma u lancu
CARC	broj aromatskih prstena s ugljikovim kosturom
CBC	broj veza u lancu
CN	ciklomatski broj
COSMO-A	površina dostupna otapalu prema COSMO modelu
COSMO-V	volumen dostupan otapalu prema COSMO modelu
CRC	broj prstena s ugljikovim kosturom
E_D	Dreidingova energija
E_{HOMO}	energija najviše popunjene molekulske orbitale
E_{LUMO}	energija najniže slobodne molekulske orbitale
E_T	ukupna energija molekule
E_π	Hückleova energija molekulskih orbitala
F(G)	Plattov indeks
FAlRC	broj fuzioniranih zasićenih prstena
FArRC	broj fuzioniranih aromatskih prstena
FRC	broj fuzioniranih prstena
H(G)	Hararyjev indeks
HARC	broj aromatskih heterocikala

Tablica 3. Pregled molekulskih deskriptora koji su korišteni za računalno simuliranje antiagregacijskog učinka flavonoida. (*nastavak*)

Simbol	Molekulski deskriptor
HBA	broj akceptorskih skupina vodikove veze
HBD	broj donorskih skupina vodikove veze
HRC	broj heterocikala
J(G)	Balabanov indeks
log$P$	logaritam koeficijenta razdjeljenja
LRS	veličina najvećeg prstena
M_r	relativna molekulska masa
MR	molarnarefraktivnost
M_s	masa supstituenta
n	indeks refrakcije
NA	broj atoma
NB	broj veza
PC	parcijalni atomski naboj
pI	izoelektrična točka
P_M	molarnapolarizabilnost
PSA	polarna površina
p_V	tlak para
RAC	broj atoma u prstenima
RBC	broj veza u prstenima
RC	broj prstena
RoBC	broj rotirajućih veza
s	topljivost
SASA	površina molekule dostupna otapalu
SRS	veličina najmanjeg prstena
Sz(G)	Szeged-indeks
T_B	temperatura vrelišta
T_F	temperatura plamišta
TPSA	topološka polarna površina
V_M	molarni volumen
V_s	volumen supstituenta

Tablica 3. Pregled molekulskih deskriptora koji su korišteni za računalno simuliranje antiagregacijskog učinka flavonoida. (*nastavak*)

Simbol	**Molekulski deskriptor**
V_W	van der Waalsov volumen
W(G)	Wienerov indeks
Wp(G)	Wienerov indeks polarnosti
WW(G)	hiper-Wienerov indeks
z_{max}	*z*-vrijednosti maksimalne projekcijske površine
z_{min}	*z*-vrijednosti minimalne projekcijske površine
ΔH_v	entalpija isparavanja
η	površinska napetost
μ	dipolni moment
π_s	hidrofobna konstanta supstituenta po Hanschu
ρ	gustoća
χ	orbitalna elektronegativnost atoma
χ(G)	Randićev indeks

3.2.4. Računalno simuliranje antiagregacijskog učinka

Dendrogrami i formiranje klastera

Za formiranje hijerarhijskih klastera, u svrhu procjene zajedničkih mehanizama djelovanja, korišten je grafički Gaussov model u kombinaciji s višedimenzijskim ponovnim uzorkovanjem u programu *pvclust* (Shimodaira 2004.) proveden u programskom jeziku R.Grafički Gaussov modelpretpostavlja multivarijantnu normalnu distribuciju promatranih podataka (molekulskih deskriptora) i mjeri uvjetnu neovisnost odnosa između dvije varijable na temelju parcijalnog koeficijenta korelacije. Ako su dvije varijable uvjetno neovisne, ne povezuju se u čvor, a u protivnom se povezuju. Na ovaj način nastaje graf bez učitelja, a predstavlja ovisnost među varijablama.

Da bi se dobio stabilan model koristi se višedimenzijsko ponovno uzorkovanje. Iz originalnog skupa podataka $X_n = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ generira se novi skup $X_{n'}^* = (x_1^*, x_2^*, \dots, x_{n'}^*)$ pri čemunovoformirani skup može biti veći, manji ili jednak početnom $(\tau = n'/n)$. Pojednostavljeno,iteracijski algoritam glasi:

```
ponovi B puta
      generiraj repliku originalnog skupa X*n',
      procijeni dendrogramX*n',
      prebroji koliko puta su spojeviiijpovezani u klaster (k)
```

Vjerojatnost pouzdanosti čvora $bp_{i,j}$(engl. *boostrapprobability*) definiranaje izrazom$bp_{i,j} = k/B$.Algoritam se ponavlja za različite vrijednosti τ te se pouzdanost pridruživanja(engl. *approximatelyunbiased*) iskazuje izrazom $au_{i,j} = 1 - \Phi(d_{i,j} - c_{i,j})$ gdje su $d_{i,j}$ i $c_{i,j}$ geometrijske vrijednosti teΦ funkcija normalne raspodjele, dobiveni na osnovi krivulje $bp_{i,j}(\tau) = 1 - \Phi(d_{i,j}/\tau - c_{i,j}\tau)$.

Formirani suklasteri uspoređeni s poznatim mehanizmima antiagregacijskog djelovanja flavonoida.

Slučajna šuma

Za postavljanje QSAR modela korišten je algoritam slučajne šumeza kategoričke vrijednosti (*randomForest*, Liaw i Wiener 2002.) provedenu programskom jeziku R. Korištene su sljedeće zadane postavke:

- broj stabala koji tvore šumu (*ntree* = 500)
- broj molekulskih deskriptora nasumično odabranih za formiranje svake grane postavljen na cjelobrojnu vrijednost drugog korijena broja molekulskih deskriptora (*mtry*= $\lfloor\sqrt{131}\rfloor = 11$)
- minimalna veličina terminalnih čvorova postavljena na 1 (*nodsize*= 1).

Rezultat seklasifikacije bazira na odluci glasanja većine stabala.Pojednostavljeno, iteracijski algoritam glasi:

učitaj skup podataka *S*

ponovi *k* puta

ponovi *i* puta

formiraj podskup$S_i$skupa*S*

formiraj stablo odluke T_i iz podskupa S_i

na svakom čvoru napravi podjelu na osnovi podskupa*F* deskriptora

svako stablo maksimalno raste bez podrezivanja

donesi odluku o učinku izostavljenog spoja na osnovi većine glasova združenih stabala

Model je postavljen na skupu od 131 deskriptora i *k* = 30 flavonoida klasificiranih u aktivne (*MINaAC*< 5 µM) i inaktivne (*MINaAC*> 5 µM) s obzirom na vrijednost rezultata ADPtesta.

Za validaciju modela, temeljenog na slučajnoj šumi, primijenjen je izbaci-jedan-van (engl.*leave-one-out*) postupakkoji je ponovljen 10 puta, a rezultat je prikazan kao matrica konfuzije ili tablica istinitosti u kojoj je iskazana točnost, osjetljivost i specifičnost modela.

4.1. Učinak flavonoida na agregaciju trombocita koja je potaknutaADP-om (Bojić i sur. 2011.)

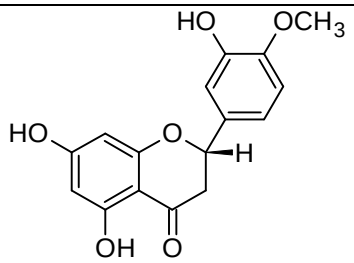
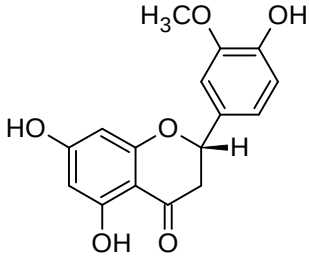
U testu agregacije trombocita koja je potaknuta ADP-om, analizirano je 6 flavanona, 10 flavona, 9 flavonola, 4 izoflavonoida i 1 flavanol (slika 1). Svih 30 analiziranih flavonoida pokazuje antiagregacijski učinak u ADPtestu uz*MINaAC* u rasponu od 0,119 μM do 122 μM (tablice 4–8).

Učinak flavanona na agregaciju trombocita koja je potaknuta ADP-om

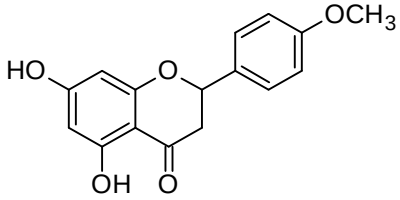
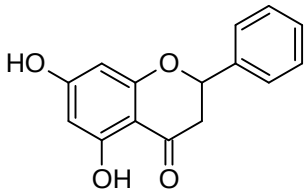
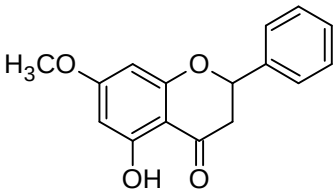
Flavanoni su derivati 2-fenil-2,3-dihidro-4*H*-kromen-4-ona. U ADPtestu analizirani su flavanoni hesperetin, homoeriodiktiol, izosakuranetin, pinocembrin i pinocembrin-7-metileter.

Najaktivniji flavanoni supstituirani na prstenu B su *p*-O-metilirani derivati (izosakuranetin, hesperetin). Pinocembrin-7-metileter ima manju vrijednost *MINaAC* u odnosu na pinocembrin (15,259 *vs.* 0,954 μM), što ukazuje da metilirani derivati flavanona imaju jači antiagregacijski učinak. Rezultati određivanja antiagregacijskog učinka flavanona prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Antiagregacijska aktivnost flavanona. Minimalna antiagregacijska koncentracija flavanona iskazana je u μM uz statističku značajnost (*p*).

Flavanon	**Struktura**	***MINaAC*/μM**	***p***
hesperetin		1,907	0,035
homoeriodiktiol		7,629	0,003

Tablica 4. Antiagregacijska aktivnost flavanona. Minimalna antiagregacijska koncentracija flavanona iskazana je u μM uz statističku značajnost (*p*). (*nastavak*)

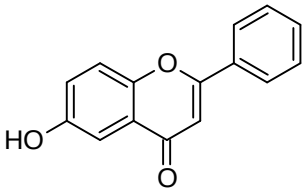
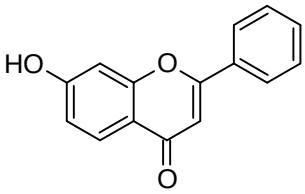
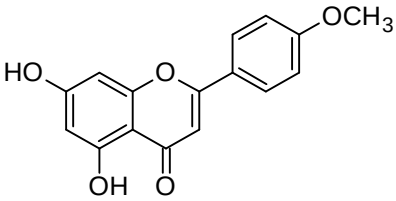
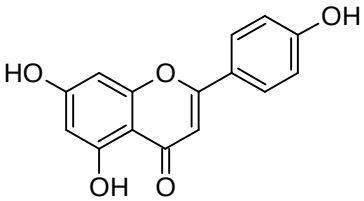
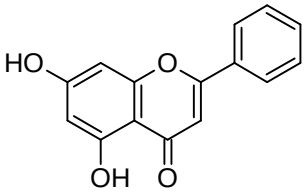
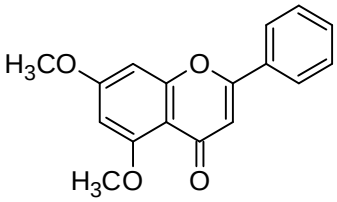
Flavanon	**Struktura**	***MINaAC*/μM**	***p***
izosakuranetin		0,954	0,037
pinocembrin		15,259	0,010
pinocembrin-7-metileter		0,954	0,025

Učinak flavona na agregaciju trombocita koja je potaknuta ADP-om

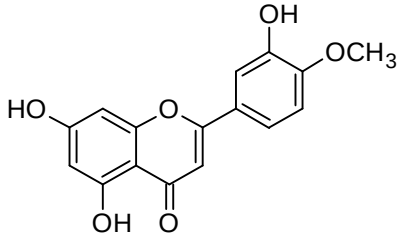
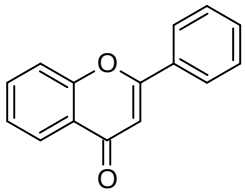
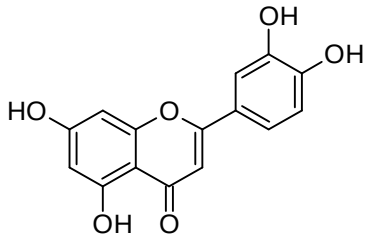
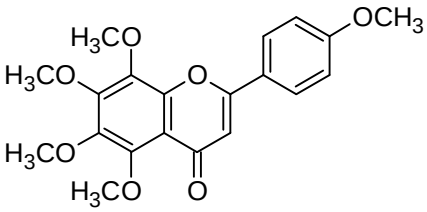
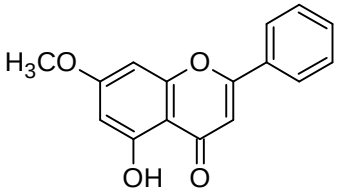
Flavoni su derivati 2-fenil-4*H*-kromen-4-ona, a u ADPtestu analizirani su 6-hidroksiflavon, 7-hidroksiflavon, akacetin, apigenin, krizin, krizin-dimetileter, diosmetin, flavon, luteolin, tangeretin i tektokrizin (tablica 5).

Najaktivniji monohidroksilirani derivat flavona je supstituiran na položaju 6 prstena A (6-hidroksiflavon, *MINaAC* = 0,954 μM). Međutim, većina je flavonoida iz prirodnih izvora hidroksilirana na položaju 7 te imaju niži antiagregacijski učinak. Porast u broju hidroksiliranih grupa ne utječe na antiagregacijski učinak (flavon, krizin, apigenin – *MINaAC* = 3,815 μM). Metilacija, za razliku od hidroksilacije, pojačava antiagregacijski učinak flavona (*MINaAC*(tektokrizin) = 0,954 <*MINaAC*(krizin) = 3,815 μM). Ukoliko flavon ima više od četiri supstituenta, aktivnost se smanjuje čak i ako je riječ o metoksi-derivatima(*MINaAC*(diosmetin) = 7,629 μM, *MINaAC*(luteolin) = 7,629 μM, *MINaAC*(tangeretin) = 30,518 μM).

Tablica 5. Antiagregacijska aktivnost flavona. Minimalna antiagregacijska koncentracija flavona iskazana je u μM uz statističku značajnost (*p*).

Flavon	**Struktura**	***MINaAC*/μM**	***p***
6-hidroksiflavon		0,954	0,030
7-hidroksiflavon		15,259	0,038
akacetin		3,815	0,013
apigenin		3,815	0,037
krizin		3,815	0,016
krizin-dimetileter		1,907	0,025

Tablica 5. Antiagregacijska aktivnost flavona. Minimalna antiagregacijska koncentracija flavona iskazana je u μM uz statističku značajnost (*p*). (*nastavak*)

Flavon	**Struktura**	***MINaAC*/μM**	***p***
diosmetin		7,629	0,021
flavon		3,815	0,037
luteolin		7,629	0,029
tangeretin		30,518	0,029
tektokrizin		0,954	0,013

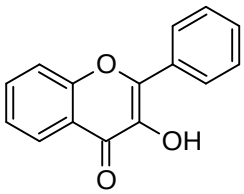
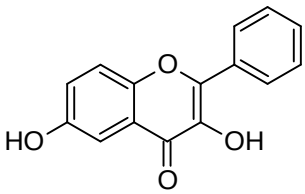
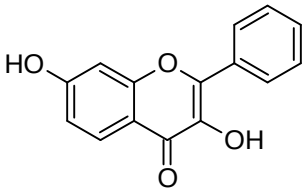
U načelu, hidroksilirani flavanoni(*MINaAC*(pinocembrin) = 0,954 μM) imaju jači antiagregacijski učinak u odnosu na flavone (*MINaAC*(krizin) = 3,815 μM), suprotno metiliranim derivatima (*MINaAC*(hesperetin) = 1,907 μM>*MINaAC*(diosmetin) = 7,629 μM, *MINaAC*(izosakuranetin) = 0,954 μM>*MINaAC*(akacetin) = 3,815 μM).

Učinak flavonola na agregaciju trombocita koja je potaknuta ADP-om

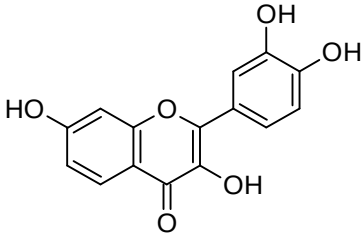
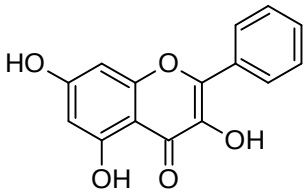
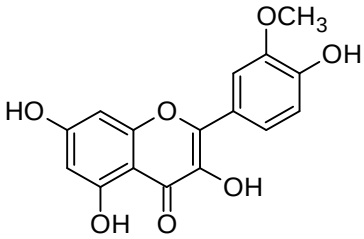
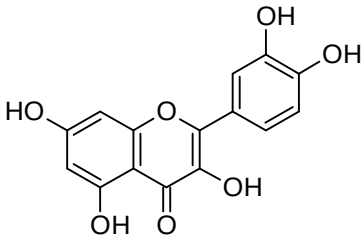
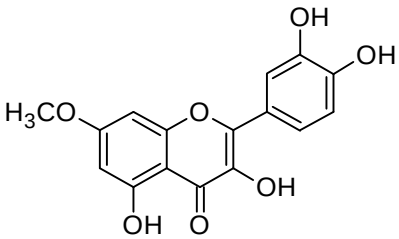
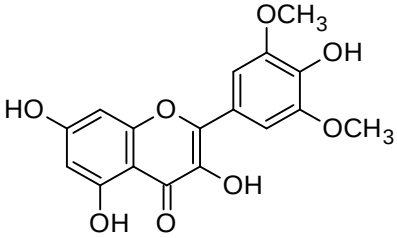
Flavonoli su derivati 3-hidroksi-2-fenil-4*H*-kromen-4-ona. U ADPtestu analizirani su 3-hidroksiflavon, 3,6-dihidroksiflavon, 3,7-dihidroksiflavon, fisetin, galangin, izoramnetin, kvercetin, ramnetin i siringetin (tablica 6).

Monohidroksilirani flavonoli imaju jači antiagregacijski učinak u odnosu na monohidroksilirane flavone (*MINaAC*(3,6-dihidroksiflavon) = 0,199 μM <*MINaAC*(6-hidroksiflavon) = 0,954 μM, *MINaAC*(3,7-dihidroksiflavon)= 1,907 μM <*MINaAC*(7-hidroksflavon) = 15,259 μM). Metilacija hidroksilnih skupina pojačava antiagregacijski učinak (*MINaAC*(siringetin) = 0,199 μM, *MINaAC*(ramnetin) = 0,954 μM, *MINaAC*(kvercetin) = 15,259 μM), dok se s porastom broja supstituenata (četiri i više) smanjuje antiagregacijski učinak, kao i u slučaju flavona.

Tablica 6. Antiagregacijska aktivnost flavonola. Minimalna antiagregacijska koncentracija flavonola iskazana je u μM uz statističku značajnost (*p*).

Flavonol	**Struktura**	***MINaAC*/μM**	***p***
3-hidroksiflavon		1,907	0,019
3,6-dihidroksiflavon		0,119	0,005
3,7-dihidroksflavon		1,907	0,001

Tablica 6. Antiagregacijska aktivnost flavonola. Minimalna antiagregacijska koncentracija flavonola iskazana je u μM uz statističku značajnost (*p*). (*nastavak*)

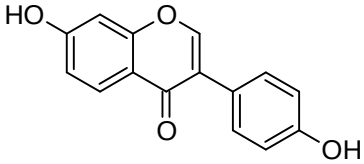
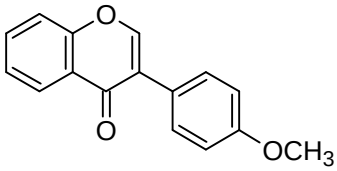
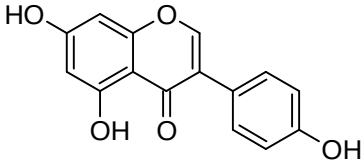
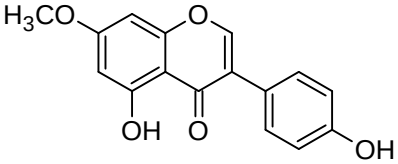
Flavonol	**Struktura**	***MINaAC*/μM**	***p***
fisetin		122,070	0,003
galangin		122,070	0,008
izoramnetin		7,629	0,029
kvercetin		15,259	0,047
ramnetin		0,954	0,041
siringetin		0,119	0,013

Učinak izoflavonoida na agregaciju trombocita koja je potaknuta ADP-om

Izoflavonoidi su derivati 3-fenil-4*H*-kromena, a u ADPtestu su analizirani daidzein, formononetin, genistein i prunetin (tablica 7).

Izoflavonoidi pokazuju najmanji antiagregacijski potencijal, ali kao i u slučaju drugih skupina flavonoida hidroksilacija smanjuje, a metilacija pojačava antiagregacijski učinak (*MINaAC*(daidzein) = 15,259 μM >*MINaAC*(formononetin) = 7,629 μM, *MINaAC*(genistein) = 30,518 μM >*MINaAC*(prunetin) = 7,629 μM).

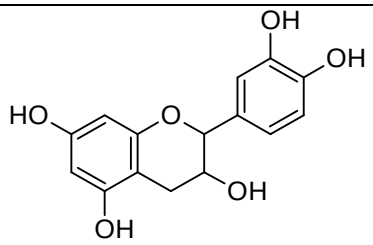
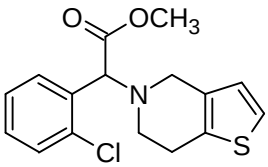
Tablica 7. Antiagregacijska aktivnost izoflavonoida. Minimalna antiagregacijska koncentracija izoflavonoida iskazana je u μM uz statističku značajnost (*p*).

Izoflavonid	**Struktura**	***MINaAC*/μM**	***p***
daidzein		15,259	0,048
formononetin		7,629	0,043
genistein		30,518	0,013
prunetin		7,629	0,033

Učinak flavanola na agregaciju trombocita koja je potaknuta ADP-om

Epikatehin (tablica 8), flavonoid prisutan u vinima, jedini je analizirani katehin, a ima jači antiagregacijski učinak (*MINaAC* = 1,907 μM) u odnosu na flavonsku i flavonolsku paralelu (*MINaAC*(luteolin) = 7,629 μM, *MINaAC*(kvercetin) = 15,259 μM).

Tablica 8. Antiagregacijske aktivnosti katehina i pozitivne kontrole. Minimalna antiagregacijska koncentracija flavanola (katehina) i pozitivne kontrole iskazana je u μM uz statističku značajnost (*p*).

Supstancija	**Struktura**	***MINaAC*/μM**	***p***
epikatehin		1,907	0,030
klopidogrel		0,119	0,029

Sumarni prikaz odnosa strukture i antiagregacijskog učinka flavonoida u testu agregacije koja je potaknuta ADP-om

Temeljem eksperimentalnih podataka, mogu se donijeti sljedeći zaključci o odnosu strukture flavonoida (slika 1) i antiagregacijskog učinka:

- dvostruka veza na položaju C2–C3 pojačava aktivnost hidroksiliranih derivata, ali smanjuje aktivnost metiliranih derivata na prstenima A i B
- hidroksilna skupina na položaju C3 pojačava antiagregacijsku aktivnost
- supstitucija prstenom B na položaju C3 umjesto C2 smanjuje antiagregacijsku aktivnost (izoflavonoidi)
- karbonilna skupina na položaju C4 smanjuje antiagregacijsku aktivnost
- najučinkovitiji su flavonoidi supstituirani na položaju C6 prstena A
- O-metilacija prstena A i B pojačava antiagregacijsku aktivnost
- ako prsteni A i B imaju četiri ili više supstituenata,antiagregacijska se aktivnost smanjuje.

Ovakav učinak hidroksilacije u odnosu na metilaciju vjerojatno je posljedica većeg volumena i lipofilnosti metilnog radikala (V = 37,15 Å^3, π = –0,09) u odnosu na hidroksilnu skupinu (V = 11,79 Å^3, π = –0,74). Veća lipofilnost može za posljedicu imati pojačanu interakciju s

membranama trombocita pojačavajući rigiditet, a time i ograničiti ekspresiju receptora na površini stanične membrane (Furusawa i sur. 2003., Hendrich 2006., O'Malley 2010.). Također, hidroksilna je grupa donor vodikove veze čiji nastanak može dovesti do neprikladne orijentacije molekule i na taj način smanjiti antiagregacijski učinak.

Usporedba MINaAC flavonoida s klopidogrelom i literaturnim podacima

Rezultati antiagregacijskog učinka uspoređeni su s klopidogrelom (*MINaAC* = 0,119 μM; tablica 8) – antagonistom ADP-a u antitrombocitnoj terapiji koji je poslužio kao pozitivna kontrola u ovom radu. Iako je rezultat antiagregacijskog učinka klopidogrela usporediv s rezultatima najaktivnijih flavonoida, 3,6-dihidroksiflavonom (*MINaAC* = 0,119 μM) i siringetinom (*MINaAC* = 0,119 μM), direktna interpretacija nije moguća jer je klopidogrel prolijek, a intenzitet metaboličke aktivacije klopidogrela u ovom eksperimentu nije poznat.

Dell'Agli i sur. (2008.)su ispitivali inhibicijski učinak na agregaciju trombocita induciranu trombinom u koncentraciji od 10 μM pojedinih flavonoida: luteolina, kvercetina i apigenina, od kojih se apigenin pokazao kao inaktivan. U našoj studiji *MINaAC*istih flavonoida je slijedio niz: apigenin (3,815 μM), luteolin (7,629 μM), kvercetin (15,259 μM), s ADP-om kao induktorom agregacije.

Uspoređujući analizirani skup flavonoida s rezultatima rada Navarro-Nuñez i sur. (2009.)u kojem je agregacijski učinak iskazan kao postotak inhibicije vezanja SQ29548 na receptoretromboksana A_2 (TxA_2), apigenin je bio najbolji inhibitor agregacije. Stoga se može zaključiti da apigenin postiže antiagregacijski učinak djelujući kao antagonist receptora TxA_2, ali i ADP- receptora. Međutim, sljedeći najučinkovitiji inhibitor receptora TxA_2 je genistein, što je suprotno učinku na receptore ADP-a na kojima izoflavonoidi pokazuju slabiji antiagregacijski učinak u odnosu na druge klase flavonoida.

Hesperetin ima *MINaAC* = 1,907 μM, što je 10 do 30 puta manja vrijednost u odnosu na rezultate Jina i sur. (2007.), koji su za indukciju agregacije primijenili jake induktore agregacije – kolagen i arahidonsku kiselinu.

U nizozemskoj studiji, koja se najčešće uzima kao referentna, dnevni unos flavonoida prehranom je 23 mg (Hertog i sur. 1993.). Ukoliko se u obzir uzme apsorpcija aglikona u organizmu koja za kvercetin iznosi 24% (Hollman i sur. 1995.), uz prosječnu relativnu

molekulsku masu 300, koncentracija koja se može postići u krvi iznosi 3,7 μM. Najučinkovitiji flavonoidi produciraju minimalni antiagregacijski učinak u koncentracijama koje su manje od navedene: 3,6-dihiroksiflavon, siringetin (*MINaAC* = 0,119 μM), 6-hidroksiflavon, pinocembrin-7-metileter, tektokrizin, ramnetin i izosakuranetin (*MINaAC* = 0,954 μM). Ovi rezultati su oprečni zaključku Janssena i sur. (1998.) da flavonoidi pokazuju aktivnost u koncentracijama koje se ne mogu postići *in vivo*.

4.2. Mehanizmi antiagregacijskog i proagregacijskog učinka flavonoida (Bojić i sur. 2012.)

Za proučavanje utjecaja flavonoida na mehanizam agregacije trombocita odabrani su najučinkovitiji flavonoidi iz testa agregacije trombocita koja je potaknuta ADP-om. Analizirani su flavanoni hesperetin i pinocembrin-7-metileter, flavanol epikatehin, flavon 6-hidroksiflavon i flavonol 3,6-dihidroksiflavon.

Flavonoidi utječu na agregaciju trombocita ili antiagregacijski ili proagregacijski ovisno o primijenjenom induktoru u testu agregacije trombocita (tablica 9). Antiagregacijski učinak zabilježen je u testu koji je potaknut ADP-om, kolagenom, TRAP-6 i ristocetinom. Primjena jakog agonista agregacije, kao što je kolagen ili TRAP-6, rezultira usporedivom vrijednošću *MINaAC* za analizirane flavonoide. *MINaAC* vrijednosti jakih agonista su od 8 do 2000 puta veće u odnosu na *MINaAC* flavonoida određene primjenom slabog agonista ADP-a.

Pignatelli i sur. (2000.) su pokazali da čak i s jakim induktorom agregacije, s produljenjem vremena inkubacije, manja koncentracija flavonoida producira jednak učinak. Značajno smanjenje u agregaciji trombocitakoja je potaknuta kolagenom, postignuto je s 20 μM-om otopinom kvercetina tijekom 30 minuta inkubacije. Jednak učinak postignut je tijekom 10 minutne inkubacije s otopinama kvercetina u koncentracijama od 40 do 100 μM.

Tablica 9. Utjecaj flavonoida na agregaciju trombocita ovisno o primijenjenom agonistu agregacije (ADP, kolagen, TRAP-6, arahidonska kiselina, ristocetin). Rezultati suizraženi kao*MINaAC* u μM, sa statističkom značajnošću (*p*) *t*-testa usporedbe uzoraka sa i bez dodatka flavonoida.

Agonist / **Flavonoid**	**ADP**		**kolagen**		**TRAP-6**		**arahidonska kiselina**		**ristocetin**	
	MINaAC	***p***	***MINaAC***	***p***	***MINaAC***	***p***	***MINaAC***	***p***	***MINaAC***	***p***
6-hidroksiflavon	0,954	0,030	122,070	0,025	61,036	0,014	7,629	0,0498	0,060	0,035
3,6-dihidroksiflavon	0,119	0,005	244,140	0,017	122,070	0,010	+		61,036	0,010
epikatehin	1,907	0,030	61,036	0,036	15,259	0,049	+		488,280	0,022
hesperetin	1,907	0,035	15,259	0,037	30,518	0,025	+		122,070	0,011
pinocembrin-7-metileter	0,954	0,025	61,036	0,042	30,518	0,013	+		15,259	0,044

Proagregacijski učinak je označen s ‘+’, a zabilježen je u analiziranom koncentracijskom rasponu od 0,06 do 488,28 μM.

Antiagregacijski učinak flavonoida

Kolagen, ristocetin i TRAP-6 dijele barem jedan zajednički signalni put koji dovodi do agregacije trombocita,kao što je npr. aktivacija fosfolipazePLC (Hubbard i sur. 2004., Peluso 2006., Wright i sur. 2010.) (slika 3). Kolagen i ristocetin mogu pojačati aktivnost PLCγ2, a trombin i ADP mogu pojačati aktivnost PLCβ izoformi preko G proteina G_qi G_i(Brass i Stalker 2008.).

Jedan od mogućih mehanizama antiagregacijskog učinka flavonoida na signalne putove,u testovima agregacije koja je potaknutakolagenom i TRAP-6, je i inhibicija različitih protein-kinaza što u konačnici rezultira smanjenjem aktivnosti PLC (Wright i sur. 2010.). Sličan mehanizam antiagregacijskog učinka flavonoidi pokazuju i na agregaciju trombocita koja je potaknutaristocetinom. Ristocetin formira kompleks s von Willebrandovim faktorom koji olakšava vezanje na GPIb/IX/V receptor dok bi se antiagregacijski učinak flavonoida mogao pripisati disocijaciji nastalog kompleksa(vWF – GPIb/IX/V receptor) kao što je pokazano *in vivo* na flavon-8-octenoj kiselini (Mruk i sur. 2000.).

ADP je slab agonist agregacije koji posreduje adheziju i agregaciju trombocita. Učinak je flavonoida na agregaciju trombocita koja je potaknutaADP-om posredovan bilo snižavanjem aktivnosti PLCβili inhibicijom fosfodiesteraze cAMP-a (Dell'Agli i sur. 2008., Peluso 2006.). Inhibicija fosfodiesteraze cAMP-a je vjerojatnija jer su koncentracije flavonoida potrebne da suprimiraju proagregacijski učinak ADP-a relativno male.*MINaAC*se nalazi u rasponu koncentracija od 0,119 μM, za 3,6-dihidoksiflavon, do 1,907 μM,za epikatehin i hesperetin.

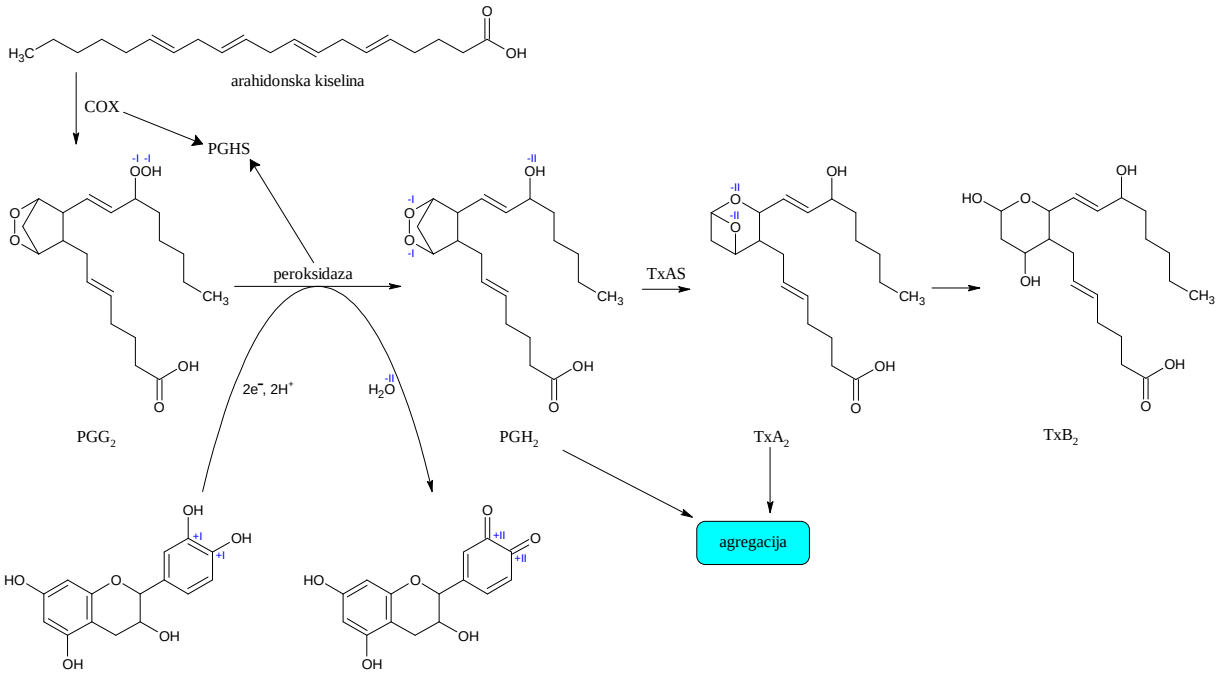
Proagregacijski učinak flavonoida

Svi polihidroksilirani flavonoidi pokazuju proagregacijski učinak, u testu agregacije trombocita koja je potaknuta arahidonskom kiselinom. Jedino monohidroksilirani 6-hidroksiflavon pokazuje antiagregacijsko djelovanje (*MINaAC* = 7,629 μM).

Do sada, interpretacija proagregacijskog učinka polihidroksiliranih flavonoida nije opisana. Najvjerojatnije je proagregacijski učinak polihidroksiliranih flavonoida, u testu agregacije trombocita koja je potaknuta arahidonskom kiselinom,posljedica elektrokemijskog potencijala, odnosno antioksidativnih svojstava flavonoida (slika 12). Flavonoidi tvore stabilne kinone koji se klasificiraju kao terminatori lančanih reakcija radikala (Jovanovic i

sur. 1996., Masek i sur. 2011.). 3,6-dihidroksiflavon i epikatehin tvore *o*-kinone na prstenu C odnosno B, dok epikatehin i hesperetin tvore*m*-kinone na prstenu A. Metilirani se derivati (pinocembrin 7-metileter, hesperetin) mogu demetiliratii*n vivo* (Booth i sur. 1997., Nielsen i sur. 1998.) oslobađajući hidroksilne grupei stvarajući kinone. Opisani mehanizam omogućuje flavonoidima da promoviraju redukciju prostaglandina G_2 u prostaglandin H_2. PGH_2 se veže na receptore tromboksana A_2 i producira sličan odgovor na agregaciju trombocita kao i jedan od glavnih induktora agregacije – TxA_2 (Michelson 2002.).

Na primjeru epikatehina (slika 12) prikazan je mogući mehanizam proagregacijskog učinka nekih flavonoida, zapažen u testu agregacije trombocitakoja je potaknuta arahidonskom kiselinom.



Slika 12. Bioaktivacija arahidonske kiseline. Kratice: AA, arahidonska kiselina; COX, ciklooksigenaza; PGG_2, PGH_2, prostaglandin G_2 i H_2; PGHS, prostaglandin H sintaza; TxA_2, TxB_2, tromboksan A_2 i B_2; TxAS, tromboksan A_2 sintaza.

6-hidroksiflavon i mehanizmi antiagregacijskog učinka

Antiagregacijski učinak monohidroksiliranog flavonoida 6-hidroksiflavona, u testu agregacije trombocita koja je potaknuta arahidonskom kiselinom, sugerira da je osnovni mehanizam djelovanja različit u odnosu na analizirane polihidroksilirane flavonoide i potencijalno neovisan o induktoru agregacije. Takav je nespecifičan mehanizam antiagregacijskog djelovanja već opisan kao modificirajuće djelovanje na lipidni dvosloj (Saija i sur. 1995.) odnosno povećanje rigidnosti membrane trombocita što onemogućuje izlaganje površinskih receptora (Furusawa i sur. 2003., Guerrero i sur. 2005.). Osim utjecaja na membranske receptore, promjene na lipidnom dvosloju mogu utjecati i na aktivnost enzima koji su vezani na membranu, kao što je ciklooksigenaza.

Rezultati testova agregacije trombocita sugeriraju da svi analizirani flavonoidi utječu na agregaciju trombocita aktivacijomsignalnih putova koji suovisni o kalcijui to u dijelu koji prethodi aktivaciji fosfolipaze A2 (slika 3). Promjene u lipidnom dvosloju mogu utjecati na funkciju membranskih proteina kao što su PLC, COX i drugi receptori. Zajedno s činjenicom da se 6-hidroksiflavon ponaša kao univerzalni antiagregacijski agens, modifikacija se lipidnog dvosloja nameće kao potencijalni zajednički mehanizam antiagregacijskog djelovanja. To je ujedno i jedini mehanizam djelovanja flavonoida na agregaciju trombocita, neovisan o primijenjenom induktoru agregacije, a u skladu je s dobivenim rezultatima.

Klinički značaj antiagregacijskog učinka flavonoida

Koncentracije flavonoida koje značajno smanjuju agregaciju trombocita, ovisno o induktoru agregacije, kretale su se u rasponima: ADP od 0,119 μM (3,6-dihidroksiflavon) do 1,907 μM (epikatehin, hesperetin), kolagen od 15,259 μM (hesperetin) do 244,140 μM (3,6-dihidroksiflavon), TRAP-6 od 15,259 μM (epikatehin) do 122,070 μM (3,6-dihidroksiflavon), ristocetin od 0,060 μM (6-hidroksiflavon) do 488,280 μM (epikatehin), dok je proagregacijski učinak u testu agregacije trombocita koja je potaknuta arahidonskom kiselinom u rasponu koncentracija od 0,060 do 488,280 μM, osim za 6-hidroksiflavon (tablica 9). Koncentracije flavonoida,nakonkonzumacije hrane bogate flavonoidima (citrusi, čokolada, zeleni čaj, vino, propolis), ana temelju farmakokinetičkih studija provedenih na zdravim dobrovoljcima, kreću se u rasponima koji se mogu postići *in vivo*. Maksimalna se plazmatska koncentracija hesperetina kretala u rasponu od 1,150 do 1,310 μM nakon konzumacije 1L soka od

naranče(Manach i sur. 2003.) dok je vršna koncentracija epi/galo/katehina nakon konzumacije zelenog čaja sa 634 μmol flavanola bila u rasponu od 0,101 do 0,256 μM (Stalmach i sur. 2010.). Dakle, može se pretpostaviti da flavonoidi mogu imati utjecaj na *in vivo* agregaciju trombocita, ali i utjecati*ex vivo*na mjerenja agregacije trombocita kod pacijenata koji konzumiraju hranu bogatu polifenolima. Stoga bi se prilikom interpretacije rezultata agregacije trombocita trebale imati na umu i prehrambene navike pacijenata, posebice tijekom terapije klopidogrelom i acetilsalicilnom kiselinom. Konzumacija bi hrane bogate flavonoidima mogla također objasniti povećane vrijednosti agregacije trombocita u testu koji je osjetljiv na acetilsalicilnu kiselinu (ASPItest), dok bi se rezultati vezani uz aktivnost von Willebrandova faktora mogli pogrešno tumačiti u slučaju ristocetin testa.

4.3. Računalna simulacija antiagregacijskog učinka

Molekulski deskriptori

Za postavljanje QSAR modela korišten je skup od 30 flavonoida iz testa agregacije koja je potaknuta ADP-om. Generirano je ukupno 155 molekulskih deskriptora od kojih su oni korišteni za QSAR modeliranje navedeni u tablicama 10–19.

Jednostavni i ciklički deskriptori su se pokazali neprikladnim za usporedbu homogenog skupa flavonoida jer su u načelu nosili istu informaciju:

- ciklomatski broj:CN = 3
- broj prstena: RC = 3
- broj atoma u prstenima: RAC = 16
- broj veza u prstenima: RBC = 17
- broj ugljikovih prstena: CRC = 2
- broj heterocikala: HRC = 1
- broj aromatskih ugljikovih prstena: CARC = 2
- broj fuzioniranih prstena: FRC = 2
- broj fuzioniranih alifatskih prstena: FAlRC = 0
- veličina najvećeg prstena: LRS = 6
- veličina najmanjeg prstena: SRS = 6.

Molekulski deskriptori, odnosno varijable sa standardnom devijacijom jednakom nuli ili s malom standardnom devijacijom, ne donose nikakvu informaciju o sustavu te se smatraju beskorisnima za modeliranje (Livingstone 2009.). Stoga su zadržane samo vrijednosti ukupnog broja atoma (NA), ukupnog broja veza (NB), broj atoma u lancu (CAC), broj veza u lancu (CBC), broj rotirajućih veza (RBC), broj aromatskih prstena (ArRC), broj atoma u alifatskim vezama (AlAC) ibroj alifatskih veza (AlBC) (tablica 10).

Od jednostavnih su deskriptora zadržani deskriptori vodikove veze i broj slobodnih rotirajućih veza (tablica 10) jer potencijalno dobro opisuju moguće interakcije između flavonoida i ciljanih meta (npr. receptora) kojima se ostvaruje antiagregacijski učinak (Kubinyi 2004., Todeschini i Consonni 2000.).

Osim jednostavnih topoloških deskriptora kojima se prebrojavaju atomi, veze i prsteni, generirani su i globalni deskriptori. Topološki se indeksi primarno koriste za opisivanje velikih skupova heterogenih spojeva npr. u procjeni toksičnosti (Chaudhry i sur. 2010.). To je razlogšto je broj pojedinih deskriptora bio ograničen na reprezentativne indeksepovezanosti (^{F}(G), χ(G)) i udaljenosti (J(G), H(G), W(G), WW(G), Wp(G), Sz(G)) navedene u tablici 11, iako je poznato preko tisuću topoloških molekulskih deskriptora.

Ispitivanja antiagregacijskog učinka provedena su u punoj krvi, te su za opisivanje interakcija s medijem, staničnim membranama i receptorima (Ertl i sur. 2000., Ferrara i sur. 2002., Klamt i Schüürmann 1993., Viswanadhan i sur. 1989., Zhokhova 2007.) korišteni fizičko-kemijski parametri navedeni u tablici 12 te geometrijski sterički parametri navedeni u tablici 13.

Elektronski i kvantno-kemijski (tablica 14) parametri dobro opisuju ponajprije potencijalno kovalentno vezivanje na receptore, ali i Londonove interakcije, te interakcije s medijem, dok elektronegativnost (tablica 15), parcijalni naboji (tablica 16), redovi veza (tablica 17) i duljine veza (tablica 18) mogu opisati potencijalni farmakofor (Todeschini i Consonni 2000.).

Za opisivanje supstituenata izračunati su volumen, hidrofobna konstanta i relativna masa supstituenta (tablica 19).

U konačnici je za formiranje hijerarhijskog klastera i QSAR modeliranje slučajnom šumomkorišten 131 deskriptor.

Tablica 10. Izračunane vrijednosti 0D-deskriptora, deskriptora vodikove veze i indeksa fleksibilnosti.

Deskriptor / Flavonoid	NA	NB	CAC	CBC	RBC	ArRC	AlAC	AlBC	HBA	HBD	B_{FR}
hesperetin	36	38	6	7	2	2	10	12	6	3	5
homoeriodiktiol	36	38	6	7	2	2	10	12	6	3	5
izosakuranetin	35	37	5	6	2	2	9	11	5	2	4
pinocembrin	31	33	3	4	1	2	7	9	4	2	3
pinocembrin-7-metileter	34	36	4	5	2	2	8	10	4	1	3
6-OH-flavon	28	30	2	3	1	3	2	3	3	1	2
7-OH-flavon	28	30	2	3	1	3	2	3	3	1	2
akacetin	33	35	5	6	2	3	5	6	5	2	4
apigenin	30	32	4	5	1	3	4	5	5	3	4
krizin	29	31	3	4	1	3	3	4	4	2	3
krizin-dimetileter	35	37	5	6	3	3	5	6	4	0	3
diosmetin	34	36	6	7	2	3	6	7	6	3	5
flavon	27	29	1	2	1	3	1	2	2	0	1
luteolin	31	33	5	6	1	3	5	6	6	4	5
tangeretin	47	49	11	12	6	3	11	12	7	0	6
tektokrizin	32	34	4	5	2	3	4	5	4	1	3
3-OH-flavon	28	30	2	3	1	3	2	3	3	1	2
3,6-diOH-flavon	29	31	3	4	1	3	3	4	4	2	3
3,7-diOH-flavon	29	31	3	4	1	3	3	4	4	2	3
fisetin	31	33	5	6	1	3	5	6	6	4	5
galangin	30	32	4	5	1	3	4	5	5	3	4
izoramnetin	35	37	7	8	2	3	7	8	7	4	6
kvercetin	32	34	6	7	1	3	3	6	7	5	6
ramnetin	35	37	7	8	2	3	7	8	7	4	6
siringetin	39	41	9	10	3	3	9	10	8	4	7
daidzein	29	31	3	4	1	3	3	4	4	2	3
formononetin	32	34	4	5	2	3	4	5	4	1	3
genistein	30	32	4	5	1	3	4	5	5	3	4
prunetin	33	35	5	6	2	3	5	6	5	2	4
epikatehin	35	37	5	6	1	2	9	11	6	5	6

NA – broj atoma
NB – broj veza
CAC – broj atoma u lancu
CBC –broj veza u lancu
RBC – broj rotirajućih veza
ArRC – broj aromatskih prstena
AlAC – broj atoma u alifatskim vezama
AlAC – broj alifatskih veza
HBA – broj akceptora vodikove veze
HBD – broj donora vodikove veze
B_{FR}– broj slobodnih rotirajućih veza

Tablica 11. Izračunane vrijednosti topoloških indeksa.

Deskriptor / Flavonoid	*F*(G)	*χ*(G)	*J*(G)	*H*(G)	*W*(G)	*WW*(G)	*Wp*(G)	*Sz*(G)
hesperetin	70	10,49	1,64	77,86	1038	3587	38	1919
homoeriodiktiol	70	10,49	1,66	78,07	1025	3471	38	1893
izosakuranetin	66	10,08	1,41	72,37	926	3169	35	1728
pinocembrin	60	9,15	1,60	63,36	670	2021	31	1292
pinocembrin-7-metileter	62	9,69	1,52	67,96	779	2445	33	1472
6-OH-flavon	56	8,74	1,63	58,03	591	1782	28	1153
7-OH-flavon	56	8,74	1,64	58,09	586	1737	28	1138
akacetin	66	10,08	1,41	72,73	926	3169	35	1728
apigenin	64	9,54	1,50	67,99	788	2526	33	155
krizin	60	9,15	1,60	63,36	670	2021	31	1292
krizin-dimetileter	64	10,22	1,47	72,92	888	2853	35	1654
diosmetin	70	10,49	1,64	77,86	1038	3587	38	1919
flavon	52	8,34	1,37	53,38	500	1432	26	985
luteolin	68	9,95	1,45	73,24	896	2934	36	1686
tangeretin	82	13,09	1,73	106,36	1738	6462	51	3088
tektokrizin	62	9,69	1,52	67,96	779	2445	33	1472
3-OH-flavon	56	8,77	1,70	58,85	565	1605	30	1101
3,6-diOH-flavon	60	9,16	1,62	63,66	662	1976	32	1280
3,7-diOH-flavon	60	9,16	1,63	63,70	658	1938	32	1268
fisetin	68	9,97	1,48	73,68	878	2800	37	1650
galangin	64	9,58	1,59	69,17	747	2237	35	1430
izoramnetin	74	10,92	1,66	84,33	1122	3764	42	2064
kvercetin	72	10,38	1,74	79,35	986	3199	40	1846
ramnetin	74	10,92	1,66	84,27	1124	3780	42	2074
siringetin	80	11,87	1,58	95,53	1392	4819	47	2506
daidzein	60	9,15	1,54	62,81	694	2208	31	1328
formononetin	62	9,69	1,44	67,10	821	2788	33	1537
genistein	64	9,56	1,52	68,32	781	2492	34	1479
prunetin	66	10,10	1,44	72,92	908	3051	36	1698
epikatehin	68	9,95	1,45	73,26	894	2918	36	1682

F(G) – Plattov indeks
χ(G) – Randićev indeks
J(G) – Balabanov indeks
H(G) – Hararyjev indeks
W(G) – Wienerov indeks
WW(G) – hiper-Wienerov indeks
Wp(G) – Wienerov indeks polarnosti
Sz(G) – Szeged-indeks

Tablica 12. Predviđene vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara.

Deskriptor / Flavonoid	logP_{ACD}	ρ	η	T_F	ΔH_v	T_B	p_V	s	logP_{chem}
hesperetin	2,90	1,458	67,4	223,0	90,79	586,2	2,45E-14	1288,40	2,70
homoeriodiktiol	2,90	1,458	67,4	222,1	98,48	583,8	3,14E-14	1288,40	2,70
izosakuranetin	3,84	1,370	59,0	205,6	84,72	539,2	3,06E-12	1952,20	3,01
pinocembrin	3,93	1,386	62,7	199,3	81,16	511,1	4,65E-11	3713,50	3,17
pinocembrin-7-metileter	4,11	1,284	51,4	188,8	79,13	494,9	2,03E-10	318,94	3,33
6-OH-flavon	3,72	1,340	58,2	176,3	73,62	450,1	1,02E-08	100,56	2,73
7-OH-flavon	3,32	1,340	58,2	176,3	73,62	450,1	1,02E-08	100,56	2,73
akacetin	3,15	1,420	63,4	198,2	82,10	518,6	2,25E-11	326,28	2,91
apigenin	2,10	1,548	79,5	217,0	86,81	555,5	6,00E-13	412,01	2,75
krizin	2,88	1,443	68,2	192,5	78,76	491,9	2,67E-10	620,15	3,07
krizin-dimetileter	3,27	1,242	46,3	213,4	74,03	476,6	3,01E-09	0,93	2,75
diosmetin	3,10	1,512	72,8	220,3	89,55	576,7	6,73E-14	215,42	2,60
flavon	3,56	1,239	49,5	171,1	61,35	367,0	1,41E-05	3,30	3,05
luteolin	2,40	1,654	92,5	239,5	94,73	616,1	9,30E-16	272,77	2,43
tangeretin	2,66	1,244	43,5	248,4	84,92	565,3	8,41E-13	0,13	2,29
tektokrizin	3,13	1,329	55,1	186,8	78,20	487,4	4,00E-10	53,29	3,23
3-OH-flavon	3,76	1,367	62,0	151,5	67,88	393,7	6,63E-07	3,54	2,79
3,6-diOH-flavon	3,64	1,472	72,7	186,2	78,05	477,1	6,55E-10	107,32	2,48
3,7-diOH-flavon	3,27	1,470	72,7	186,2	78,05	477,1	6,55E-10	107,32	2,48
fisetin	2,52	1,688	98,9	233,0	93,84	599,4	3,23E-15	436,31	1,84
galangin	2,83	1,579	84,9	202,0	82,11	518,6	2,24E-11	659,18	2,91
izoramnetin	1,76	1,634	88,3	227,8	92,53	599,4	5,79E-15	226,89	2,34
kvercetin	2,08	1,799	114,8	248,1	98,26	642,4	4,24E-17	288,02	2,18
ramnetin	2,58	1,634	88,3	238,9	97,68	627,9	1,24E-16	226,89	2,34
siringetin	1,34	1,591	80,6	231,9	95,58	622,4	4,38E-16	116,90	2,19
daidzein	2,78	1,443	68,2	201,2	81,37	512,8	3,87E-11	620,15	2,70
formononetin	2,96	1,329	55,1	183,4	77,20	479,4	8,17E-10	53,29	2,86
genistein	2,96	1,548	79,5	217,1	86,81	555,5	6,00E-13	412,01	3,03
prunetin	3,53	1,420	63,4	209,7	85,64	546,5	1,49E-12	326,28	3,20
epikatehin	0,49	1,593	88,1	335,0	98,01	630,4	9,29E-17	4671,10	1,76

logP_{ACD}– log$P$ preuzet iz ACD/Labs
ρ– gustoća
η– površinska napetost
T_F– temperatura plamišta
ΔH_v– entalpija isparavanja
T_B– temperatura vrelišta
p_V– tlak para
s– topljivost
logP_{chem}– log$P$ preuzet s *chemicalize.org*

Tablica 13. Izračunane vrijednosti geometrijskih i steričkih molekulskih deskriptora.

Deskriptor / Flavonoid	COSMO-A	COSMO-V	PSA	SASA	TPSA	M_r	A_{max}	A_{min}	E_D	V_W	z_{max}	z_{min}
hesperetin	302	329	96	396	63	302,3	74,0	48,3	56,8	255,2	8,0	13,6
homoeriodiktiol	303	330	96	396	63	302,3	78,1	48,1	57,3	255,2	7,4	11,0
izosakuranetin	296	321	76	388	54	286,3	82,4	38,6	54,1	246,6	6,7	15,5
pinocembrin	266	287	67	340	45	256,3	74,9	36,8	48,6	220,5	6,2	13,2
pinocembrin-7-metileter	285	309	377	377	45	270,3	81,8	40,3	52,1	238,1	6,4	14,1
6-OH-flavon	256	271	47	305	36	238,2	73,2	32,7	46,3	205,1	6,5	14,2
7-OH-flavon	255	270	47	305	36	238,2	73,8	33,7	46,2	205,0	7,0	13,5
akacetin	292	314	76	364	54	284,3	83,4	39,4	54,2	239,7	6,0	15,2
apigenin	273	293	87	326	54	270,2	77,8	34,5	51,2	222,0	6,1	13,9
krizin	262	280	67	315	45	254,2	75,8	33,7	49,1	213,5	7,0	13,5
krizin-dimetileter	301	324	45	389	45	289,3	77,6	41,6	55,8	248,9	6,7	14,2
diosmetin	302	324	96	374	63	300,3	85,0	38,9	56,6	248,0	7,4	15,6
flavon	245	258	26	294	26	222,2	71,0	32,1	44,1	196,5	6,5	13,5
luteolin	282	303	107	337	63	286,2	80,3	38,7	53,3	230,5	6,3	14,3
tangeretin	370	424	72	532	72	372,4	103,9	53,0	72,4	327,0	6,8	17,1
tektokrizin	282	302	56	352	45	268,3	81,6	36,5	52,8	231,0	6,9	14,2
3-OH-flavon	251	267	47	305	36	238,2	73,0	32,2	46,9	205,0	6,5	13,5
3,6-diOH-flavon	261	280	67	316	45	254,2	75,3	32,2	48,9	213,5	6,5	14,2
3,7-diOH-flavon	261	279	67	316	45	254,2	75,8	34,0	48,9	213,6	7,0	13,5
fisetin	280	302	107	338	63	286,2	79,9	38,1	53,0	230,5	6,5	14,3
galangin	269	289	87	326	54	270,2	77,8	33,7	51,9	222,0	7,0	13,5
izoramnetin	305	331	116	385	72	316,3	89,3	42,7	59,5	256,6	5,8	14,5
kvercetin	287	310	127	348	72	302,2	82,1	39,7	55,9	239,0	6,5	14,3
ramnetin	305	332	116	385	72	316,3	87,9	41,8	59,7	256,6	6,5	15,0
siringetin	331	362	126	433	82	346,3	92,4	47,0	65,2	282,7	8,0	14,5
daidzein	262	280	67	315	45	254,2	75,0	32,5	50,5	213,6	5,3	14,8
formononetin	281	300	56	352	45	268,3	81,8	32,6	54,1	231,2	6,0	15,7
genistein	269	290	87	325	87	270,2	78,5	35,0	53,5	222,2	5,6	14,9
prunetin	288	311	76	362	54	284,3	81,7	35,9	57,1	239,7	6,0	16,0
epikatehin	289	317	110	373	55	290,3	73,4	45,4	55,6	244,0	7,4	13,0

COSMO-A – površina dostupna otapalu prema COSMO modelu
COSMO-V – volumen dostupan otapalu prema COSMO modelu
PSA – polarna površina
SASA – površina molekule dostupna otapalu
TPSA – topološka polarna površina
M_r– relativna molekulska masa
A_{max}– maksimalna projekcijska površina
A_{min}– minimalna projekcijska površina
E_D– Dreidingova energija
V_W– van der Waalsov volumen
z_{max}–z-vrijednost maksimalne projekcijske površine
z_{min}–z-vrijednost minimalne projekcijske površine

Tablica 14. Izračunane vrijednosti globalnih elektronskih i kvantno-kemijskih deskriptora.

Deskriptor / Flavonoid	MR_{ACD}	MR_{chem}	n	V_M	$P_{M,ACD}$ (10^{-24})	$P_{M,chem}$	E_T	E_π	E_{HOMO}	E_{LUMO}	μ
hesperetin	76,9	77,8	1,664	207,2	30,49	29,84	–4163	41,34	–8,89	–0,44	3,46
homoeriodiktiol	76,9	77,8	1,664	207,2	30,49	29,84	–4163	41,34	–9,00	–0,38	4,54
izosakuranetin	75,0	75,7	1,637	208,8	29,75	29,19	–3842	37,04	–9,18	–0,36	3,68
pinocembrin	68,4	69,3	1,661	184,8	27,10	26,66	–3367	32,73	–9,31	–0,58	3,91
pinocembrin-7-metileter	73,2	73,8	1,612	210,4	29,00	28,57	–3522	32,73	–9,21	–0,52	4,11
6-OH-flavon	66,1	69,0	1,666	177,7	26,19	25,87	–3018	31,52	–9,06	–0,84	3,00
7-OH-flavon	66,1	69,0	1,666	177,7	26,19	25,87	–3018	31,54	–9,37	–0,78	2,40
akacetin	74,6	77,4	1,668	200,1	29,59	29,01	–3814	40,18	–9,03	–0,66	3,80
apigenin	69,9	72,9	1,732	174,5	27,69	27,11	–3659	40,18	–9,07	–0,68	1,81
krizin	68,0	70,9	1,700	176,1	26,94	26,48	–3338	35,86	–9,28	–0,91	5,15
krizin-dimetileter	77,6	79,9	1,598	227,2	30,74	30,30	–3649	35,86	–9,13	–0,62	4,18
diosmetin	76,5	79,3	1,697	198,5	30,33	29,65	–4134	44,48	–8,89	–0,74	3,06
flavon	64,2	67,0	1,635	179,2	25,45	25,28	–2697	27,22	–9,30	–0,77	3,56
luteolin	71,7	74,9	1,767	172,9	28,43	27,75	–3979	44,48	–9,06	–0,78	3,45
tangeretin	97,6	99,3	1,565	299,2	38,69	37,90	–5076	48,77	–8,85	–0,64	3,70
tektokrizin	72,8	75,4	1,641	201,7	28,84	28,39	–3493	35,86	–9,21	–0,66	4,80
3-OH-flavon	65,8	68,9	1,679	174,2	26,08	25,88	–3018	31,52	–8,84	–0,88	2,66
3,6-diOH-flavon	67,7	70,9	1,712	172,6	26,82	26,49	–3338	35,83	–8,82	–0,97	1,64
3,7-diOH-flavon	67,7	70,9	1,712	172,6	26,82	26,49	–3338	35,84	–8,86	–0,87	2,14
fisetin	71,4	74,9	1,784	169,5	28,32	27,76	–3979	44,46	–8,70	–0,91	0,97
galangin	69,6	72,9	1,747	171,1	27,57	27,12	–3659	40,16	–8,81	–0,77	3,39
izoramnetin	78,1	81,3	1,740	193,5	30,96	30,13	–4455	48,78	–8,62	–0,78	1,86
kvercetin	73,3	78,9	1,823	167,9	29,06	28,42	–4300	48,78	–8,76	–1,08	1,50
ramnetin	78,1	81,3	1,740	193,5	30,96	30,31	–4455	48,78	–8,67	–1,01	1,90
siringetin	84,8	87,8	1,707	217,5	33,61	32,87	–4931	53,09	–8,67	–1,02	1,21
daidzein	68,0	69,7	1,698	176,1	26,94	26,48	–3338	35,79	–8,73	–0,60	1,97
formononetin	72,8	74,2	1,640	201,7	28,84	28,39	–3494	35,79	–8,67	–0,59	2,43
genistein	69,9	71,7	1,732	174,5	27,69	27,11	–3659	40,11	–8,80	–0,70	1,26
prunetin	74,6	76,2	1,688	200,1	29,59	29,01	–3814	40,11	–8,76	–0,64	1,85
epikatehin	73,6	74,0	1,741	182,1	29,17	28,42	–4036	41,73	–8,80	0,10	3,02

MR_{ACD}– molarna refraktivnost preuzeta iz ACD/Labs
MR_{chem}– molarna refraktivnost preuzeta s chemicalize.org
n– indeks loma
V_M– molarni volumen
$P_{M,ACD}$– molarna polarizabilnost preuzeta iz ACD/Labs
$P_{M,chem}$– molarna polarizabilnostpreuzeta s chemicalize.org
E_T– ukupna energija molekule
E_π– Hückleova energija molekulskih orbitala
E_{HOMO}– energija najviše popunjene molekulske orbitale
E_{LUMO}– energija najniže slobodne molekulske orbitale
μ– dipolni moment

Tablica 15. Izračunane vrijednosti orbitalnih elektronegativnosti (χ).

Deskriptor / Flavonoid	χ(O1)	χ(C2)	χ(C3)	χ(4C)	χ(C5)	χ(C6)	χ(C7)	χ(C8)	χ(C9)	χ(C10)	χ(R2)	χ(R3)	χ(R4)	χ(R6)	χ(R8)
hesperetin	10,93	8,88	8,37	9,88	8,96	9,28	8,73	9,09	8,74	9,29	8,37	0,00	13,10	10,72	10,66
homoeriodiktiol	10,93	8,88	8,37	9,88	8,96	9,28	8,73	9,09	8,74	9,29	8,37	0,00	13,10	10,72	10,66
izosakuranetin	10,93	8,88	8,37	9,88	8,96	9,28	8,73	9,09	8,74	9,29	8,30	0,00	13,10	10,72	10,66
pinocembrin	10,93	8,88	8,37	9,88	8,96	9,28	8,73	9,09	8,74	9,29	8,40	0,00	13,10	10,72	10,66
pinocembrin-7-metileter	10,93	8,88	8,37	9,88	8,97	9,28	8,75	9,10	8,76	9,30	8,40	0,00	13,10	10,72	10,76
6-OH-flavon	11,66	8,87	9,45	9,64	9,04	8,96	8,82	8,75	8,77	9,05	8,53	0,00	13,06	0,00	0,00
7-OH-flavon	11,70	8,87	9,45	9,59	8,82	8,79	8,54	9,02	8,93	9,26	8,53	0,00	13,05	0,00	10,64
akacetin	11,72	8,85	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,43	0,00	13,08	10,73	10,66
apigenin	11,72	8,85	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,42	0,00	13,08	10,73	10,66
krizin	11,72	8,87	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,53	0,00	13,08	10,73	10,66
krizin-dimetileter	11,72	8,87	9,47	9,69	9,06	9,31	8,81	9,10	8,82	9,33	8,53	0,00	13,06	10,84	10,77
diosmetin	11,72	8,87	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,50	0,00	13,08	10,73	10,66
flavon	11,68	8,87	9,45	9,62	8,94	8,69	8,28	8,48	8,68	9,17	8,53	0,00	13,05	0,00	0,00
luteolin	11,72	8,86	9,47	9,68	9,03	9,29	8,78	9,09	8,80	9,32	8,50	0,00	13,08	10,73	10,66
tangeretin	11,79	8,86	9,48	9,73	9,21	9,40	9,36	9,55	9,37	9,42	8,43	0,00	13,06	10,93	11,01
tektokrizin	11,72	8,87	9,47	9,68	9,04	9,29	8,79	9,10	8,82	9,33	8,53	0,00	13,08	10,73	10,77
3-OH-flavon	11,80	9,10	9,42	9,83	8,97	8,74	8,29	8,52	8,70	9,21	8,56	10,92	13,25	0,00	0,00
3,6-diOH-flavon	11,78	9,10	9,42	9,85	9,07	9,00	8,84	8,79	8,79	9,09	8,56	10,92	13,26	0,00	0,00
3,7-diOH-flavon	11,82	9,10	9,42	9,80	8,85	8,84	8,56	9,07	8,95	9,31	8,56	10,92	13,25	0,00	10,65
fisetin	11,82	9,10	9,42	9,80	8,85	8,84	8,56	9,07	8,95	9,31	8,52	10,92	13,25	0,00	10,65
galangin	11,84	9,11	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,56	10,92	13,29	10,74	10,67
izoramnetin	11,84	9,10	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,52	10,92	13,29	10,74	10,67
kvercetin	11,84	9,10	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,52	10,92	13,29	10,74	10,67
ramnetin	11,84	9,10	9,44	9,89	9,07	9,34	8,81	9,14	8,83	9,37	8,52	10,92	13,29	10,74	10,77
siringetin	11,84	9,12	9,44	9,89	9,06	9,34	8,79	9,13	8,82	9,37	8,60	10,92	13,29	10,74	10,67
daidzein	11,63	8,96	9,22	9,61	8,82	8,80	8,54	9,03	8,93	9,27	0,00	8,35	13,09	0,00	10,64
formononetin	11,63	8,96	9,22	9,61	8,82	8,80	8,54	9,03	8,93	9,27	0,00	8,36	13,09	0,00	9,03
genistein	11,65	8,96	9,24	9,70	9,03	9,30	8,77	9,09	8,80	9,33	0,00	8,35	13,13	10,73	10,66
prunetin	11,65	8,96	9,24	9,70	9,04	9,30	8,79	9,11	8,81	9,33	0,00	8,35	13,13	10,73	10,77
epikatehin	10,87	9,07	8,81	8,38	8,69	8,91	8,63	8,87	8,64	8,92	8,38	9,36	0,00	10,64	10,62

Tablica 16. Izračunane vrijednosti parcijalnih naboja (PC).

Deskriptor / Flavonoid	PC (O1)	PC (C2)	PC (C3)	PC (C4)	PC (C5)	PC (C6)	PC (C7)	PC (C8)	PC (C9)	PC (C10)	PC (R2)	PC (R3)	PC (R4)	PC (R6)	PC (R7)	PC (R8)	PC (R9)
hesperetin	–0,205	0,083	–0,240	0,284	–0,285	0,206	–0,357	0,176	–0,240	0,185	–0,012	0,130	–0,271	0,013	0,142	–0,014	0,172
homoeriodiktiol	–0,205	0,083	–0,241	0,284	–0,286	0,201	–0,302	0,176	–0,299	0,191	–0,011	0,131	–0,271	0,014	0,158	–0,015	0,157
izosakuranetin	–0,204	0,086	–0,241	0,284	–0,286	0,200	–0,303	0,176	–0,299	0,192	–0,005	0,129	–0,272	0,014	0,158	–0,015	0,158
pinocembrin	–0,204	0,080	–0,236	0,295	–0,345	0,221	–0,249	0,175	–0,301	0,196	–0,003	0,132	–0,333	0,014	0,175	–0,012	0,158
pinocembrin-7-metileter	–0,205	0,080	–0,235	0,295	–0,343	0,217	–0,250	0,175	–0,290	0,192	–0,004	0,132	–0,334	0,011	0,173	–0,010	0,161
6-OH-flavon	–0,133	0,146	–0,305	0,311	–0,155	–0,138	0,049	–0,104	–0,125	0,062	0,074	0,169	–0,307	0,163	–0,026	0,159	0,157
7-OH-flavon	–0,134	0,140	–0,297	0,315	–0,231	–0,008	–0,247	0,131	–0,195	0,133	0,074	0,169	–0,311	0,163	0,143	–0,017	0,171
akacetin	–0,138	0,137	–0,294	0,319	–0,256	0,196	–0,294	0,172	–0,292	0,172	0,075	0,167	–0,286	0,019	0,160	–0,014	0,158
apigenin	–0,136	0,137	–0,295	0,319	–0,256	0,202	–0,349	0,171	–0,232	0,165	0,074	0,167	–0,287	0,018	0,143	–0,014	0,173
krizin	–0,135	0,145	–0,295	0,328	–0,313	0,215	–0,239	0,170	–0,294	0,175	0,078	0,172	–0,348	0,019	0,176	–0,011	0,158
krizin-dimetileter	–0,138	0,126	–0,288	0,318	–0,254	0,191	–0,283	0,168	–0,281	0,166	0,068	0,167	–0,288	0,021	0,161	–0,015	0,159
diosmetin	–0,139	0,132	–0,288	0,318	–0,256	0,197	–0,294	0,173	–0,293	0,172	0,070	0,169	–0,284	0,020	0,160	–0,013	0,157
flavon	–0,136	0,142	–0,300	0,311	–0,194	–0,047	–0,166	–0,078	–0,159	0,097	0,073	0,168	–0,307	0,161	0,141	0,140	0,154
luteolin	–0,135	0,130	–0,288	0,318	–0,257	0,197	–0,294	0,173	–0,291	0,172	0,065	0,168	–0,284	0,019	0,160	–0,013	0,159
tangeretin	–0,130	0,135	–0,296	0,319	–0,241	0,181	–0,089	0,144	–0,087	0,136	0,075	0,167	–0,284	0,037	–0,039	0,011	–0,040
tektokrizin	–0,138	0,127	–0,287	0,318	–0,255	0,193	–0,294	0,172	–0,281	0,168	0,070	0,168	–0,285	0,018	0,158	–0,012	0,160
3-OH-flavon	–0,124	0,091	–0,098	0,295	–0,199	–0,041	–0,170	–0,070	–0,162	0,109	0,088	–0,003	–0,318	0,160	0,143	0,141	0,157
3,6-diOH-flavon	–0,122	0,096	–0,102	0,294	–0,160	–0,135	0,046	–0,094	–0,129	0,076	0,090	–0,003	–0,318	0,163	–0,024	0,161	0,160
3,7-diOH-flavon	–0,122	0,088	–0,094	0,299	–0,236	–0,001	–0,250	0,139	–0,200	0,145	0,089	–0,002	–0,323	0,163	0,144	–0,013	0,174
fisetin	–0,120	0,090	–0,094	0,300	–0,236	–0,002	–0,250	0,140	–0,199	0,145	0,083	–0,003	–0,323	0,163	0,144	–0,013	0,176
galangin	–0,124	0,072	–0,085	0,305	–0,261	0,203	–0,298	0,182	–0,297	0,182	0,085	0,000	–0,297	0,020	0,162	–0,010	0,160
izoramnetin	–0,123	0,077	–0,088	0,305	–0,261	0,203	–0,298	0,182	–0,295	0,182	0,081	–0,002	–0,298	0,020	0,161	–0,009	0,162
kvercetin	–0,123	0,099	–0,094	0,310	–0,314	0,219	–0,242	0,179	–0,298	0,184	0,091	–0,003	–0,361	0,021	0,178	–0,006	0,161
ramnetin	–0,122	0,102	–0,097	0,310	–0,314	0,224	–0,291	0,178	–0,237	0,173	0,090	–0,005	–0,365	0,017	0,165	–0,003	0,175
siringetin	–0,117	0,101	–0,095	0,310	–0,315	0,226	–0,302	0,179	–0,236	0,176	0,088	–0,003	–0,364	0,019	0,162	–0,006	0,178
daidzein	–0,127	0,032	–0,187	0,323	–0,232	–0,008	–0,246	0,132	–0,192	0,125	0,185	0,039	–0,308	0,164	0,143	–0,016	0,173
formononetin	–0,130	0,028	–0,183	0,322	–0,232	–0,016	–0,190	0,135	–0,253	0,132	0,184	0,041	–0,307	0,165	0,160	–0,015	0,157
genistein	–0,125	0,037	–0,186	0,336	–0,314	0,223	–0,298	0,171	–0,231	0,159	0,187	0,043	–0,348	0,017	0,161	–0,009	0,175
prunetin	–0,126	0,038	–0,187	0,337	–0,314	0,220	–0,287	0,170	–0,231	0,155	0,186	0,041	–0,349	0,015	0,164	–0,006	0,173
epikatehin	–0,206	0,084	0,010	–0,146	–0,251	0,152	–0,274	0,140	–0,216	0,148	–0,007	–0,112	0,085	–0,026	0,155	–0,021	0,169

Tablica 17. Izračunane vrijednosti redova veza (BO).

Deskriptor / Flavonoid	BO (O1–C2)	BO (C2–C3)	BO (C3–C4)	BO (C4–C5)	BO (C5–C6)	BO (C6–C7)	BO (C7–C8)	BO (C8–C9)	BO (C9–C10)	BO (C10–O1)	BO (C2–R2)	BO (C3–R3)	BO (C4–R4)	BO (C6–R6)	BO (C7–R7)	BO (C8–R8)	BO (C9–R9)	BO (C5–C10)
hesperetin	0,936	0,960	0,926	0,965	1,298	1,347	1,334	1,346	1,371	1,064	0,967	0,956	1,897	1,107	0,944	1,083	0,938	1,291
homoeriodiktiol	0,933	0,962	0,926	0,966	1,287	1,355	1,345	1,338	1,364	1,066	0,967	0,956	1,897	1,107	0,941	1,083	0,941	1,301
izosakuranetin	0,932	0,961	0,926	0,966	1,287	1,355	1,344	1,339	1,362	1,067	0,968	0,956	1,896	1,106	0,941	1,083	0,941	1,300
pinocembrin	0,938	0,960	0,938	0,994	1,271	1,348	1,366	1,307	1,396	1,062	0,967	0,955	1,832	1,119	0,938	1,085	0,941	1,271
pinocembrin-7-metileter	0,938	0,960	0,938	0,995	1,265	1,358	1,354	1,317	1,389	1,060	0,967	0,955	1,831	1,115	0,938	1,063	0,940	1,278
6-OH-flavon	1,045	1,723	0,992	0,953	1,343	1,411	1,303	1,483	1,314	1,024	0,996	0,938	1,837	0,938	1,057	0,942	0,942	1,360
7-OH-flavon	1,035	1,736	0,986	0,963	1,338	1,473	1,302	1,383	1,349	1,037	0,996	0,938	1,833	0,940	0,945	1,075	0,938	1,327
akacetin	1,024	1,746	0,974	0,964	1,269	1,371	1,331	1,355	1,345	1,046	1,000	0,938	1,854	1,109	0,941	1,082	0,941	1,330
apigenin	1,025	1,745	0,975	0,963	1,281	1,363	1,323	1,362	1,354	1,045	1,000	0,938	1,853	1,109	0,944	1,082	0,938	1,318
krizin	1,036	1,730	0,996	0,989	1,256	1,363	1,352	1,326	1,374	1,041	0,997	0,937	1,785	1,121	0,937	1,084	0,941	1,304
krizin-dimetileter	1,026	1,750	0,972	0,967	1,252	1,390	1,313	1,371	1,332	1,042	0,996	0,938	1,852	1,085	0,940	1,058	0,940	1,344
diosmetin	1,023	1,750	0,972	0,964	1,269	1,371	1,332	1,354	1,346	1,045	0,998	0,938	1,855	1,110	0,941	1,082	0,941	1,330
flavon	1,039	1,731	0,987	0,957	1,344	1,461	1,369	1,458	1,330	1,030	0,996	0,938	1,838	0,941	0,948	0,947	0,944	1,347
luteolin	1,025	1,750	0,972	0,965	1,269	1,372	1,331	1,354	1,347	1,045	0,997	0,938	1,855	1,109	0,941	1,083	0,941	1,328
tangeretin	1,025	1,744	0,975	0,960	1,253	1,343	1,263	1,332	1,278	1,046	1,000	0,938	1,856	1,089	1,017	1,071	1,017	1,352
tektokrizin	1,025	1,752	0,972	0,965	1,263	1,381	1,320	1,364	1,339	1,044	0,995	0,938	1,855	1,107	0,941	1,060	0,940	1,335
3-OH-flavon	1,024	1,655	0,955	0,982	1,324	1,478	1,353	1,472	1,315	1,048	1,002	1,052	1,817	0,941	0,947	0,947	0,943	1,340
3,6-diOH-flavon	1,029	1,649	0,960	0,977	1,321	1,428	1,288	1,498	1,297	1,041	1,002	1,051	1,816	0,939	1,057	0,941	0,941	1,357
3,7-diOH-flavon	1,019	1,659	0,953	0,989	1,319	1,490	1,286	1,392	1,337	1,056	1,003	1,053	1,811	0,940	0,945	1,080	0,938	1,317
fisetin	1,021	1,659	0,952	0,990	1,319	1,490	1,286	1,391	1,339	1,055	1,003	1,053	1,811	0,940	0,945	1,080	0,937	1,316
galangin	1,010	1,671	0,938	0,992	1,255	1,382	1,320	1,358	1,339	1,065	1,002	1,058	1,833	1,111	0,940	1,087	0,940	1,312
izoramnetin	1,011	1,670	0,939	0,992	1,255	1,382	1,319	1,358	1,340	1,065	1,003	1,056	1,832	1,110	0,940	1,087	0,940	1,311
kvercetin	1,022	1,652	0,964	1,019	1,239	1,376	1,339	1,329	1,368	1,058	1,007	1,052	1,760	1,122	0,937	1,090	0,940	1,288
ramnetin	1,024	1,650	0,966	1,019	1,256	1,363	1,341	1,325	1,388	1,054	1,007	1,050	1,757	1,120	0,939	1,068	0,937	1,270
siringetin	1,025	1,652	0,965	1,019	1,250	1,371	1,330	1,338	1,376	1,058	1,003	1,051	1,758	1,121	0,940	1,090	0,937	1,277
daidzein	1,066	1,733	0,961	0,964	1,337	1,474	1,301	1,382	1,352	1,032	0,917	1,007	1,842	0,939	0,945	1,077	0,938	1,327
formononetin	1,063	1,736	0,960	0,964	1,319	1,489	1,295	1,384	1,338	1,033	0,917	1,007	1,843	0,939	0,942	1,079	0,941	1,343
genistein	1,069	1,727	0,972	0,991	1,266	1,356	1,346	1,330	1,387	1,034	0,916	1,006	1,791	1,122	0,940	1,086	0,937	1,290
prunetin	1,070	1,727	0,972	0,992	1,273	1,349	1,356	1,318	1,399	1,031	0,916	1,006	1,790	1,120	0,939	1,064	0,938	1,282
epikatehin	0,948	0,935	0,958	0,988	1,328	1,364	1,346	1,353	1,367	1,045	0,967	0,997	0,959	1,071	0,942	1,071	0,939	1,327

Tablica 18. Izračunane vrijednosti duljina veza (ID).

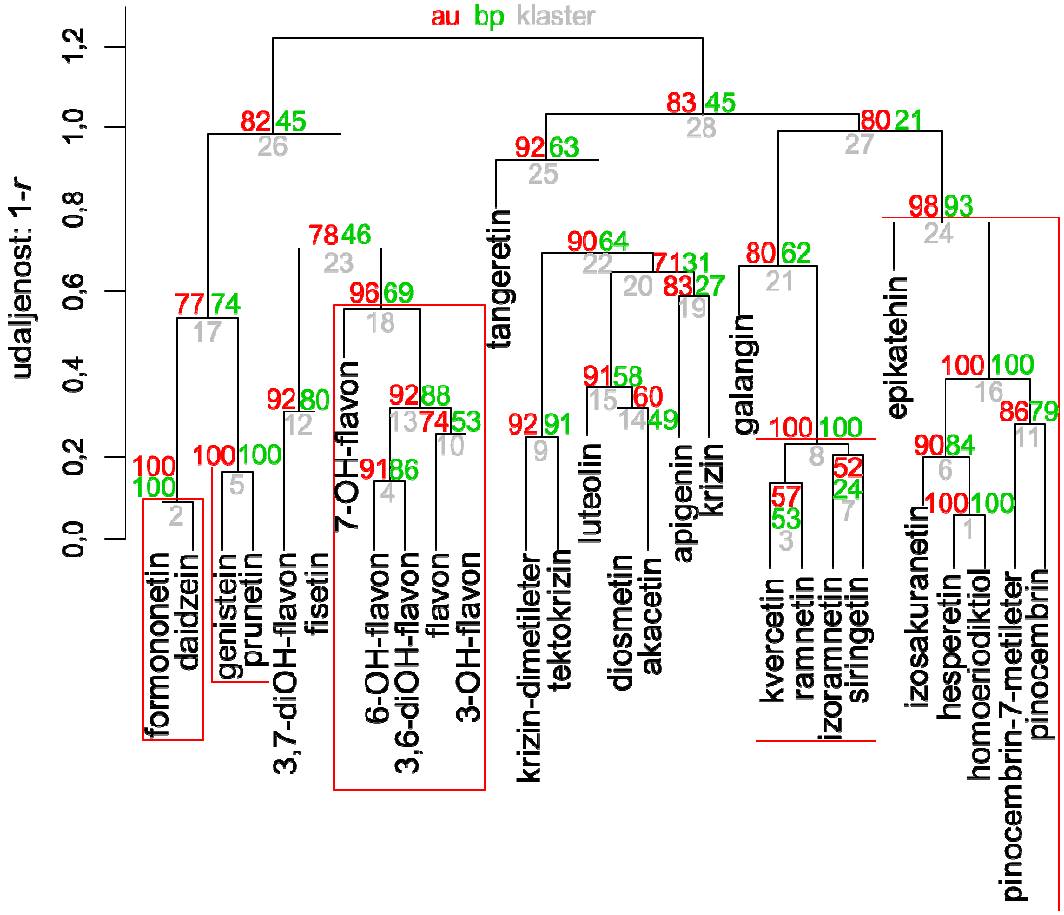
Deskriptor / Flavonoid	ID (O1–C2)	ID (C2–C3)	ID (C3–C4)	ID (C4–C5)	ID (C5–C6)	ID (C6–C7)	ID (C7–C8)	ID (C8–C9)	ID (C9–C10)	ID (C10–O1)	ID (C2–R2)	ID (C3–R3)	ID (C4–R4)	ID (C6–R6)	ID (C7–R7)	ID (C8–R8)	ID (C9–R9)	ID (C5–C10)
hesperetin	1,447	1,521	1,506	1,466	1,413	1,402	1,401	1,402	1,401	1,376	1,411	1,498	1,121	1,234	1,367	1,098	1,371	1,098
homoeriodiktiol	1,448	1,520	1,507	1,465	1,414	1,401	1,402	1,401	1,401	1,376	1,410	1,498	1,121	1,234	1,367	1,098	1,371	1,097
izosakuranetin	1,448	1,521	1,507	1,465	1,414	1,401	1,402	1,401	1,402	1,376	1,410	1,497	1,121	1,234	1,367	1,098	1,371	1,097
pinocembrin	1,445	1,521	1,503	1,460	1,416	1,406	1,398	1,404	1,397	1,377	1,415	1,498	1,121	1,242	1,363	1,098	1,371	1,098
pinocembrin-7-metileter	1,445	1,521	1,504	1,459	1,416	1,404	1,401	1,402	1,399	1,378	1,414	1,498	1,121	1,242	1,364	1,099	1,375	1,097
6-OH-flavon	1,387	1,354	1,460	1,473	1,402	1,395	1,411	1,384	1,409	1,388	1,401	1,464	1,100	1,239	1,102	1,377	1,100	1,100
7-OH-flavon	1,390	1,352	1,462	1,468	1,404	1,386	1,409	1,400	1,403	1,385	1,405	1,464	1,100	1,240	1,103	1,099	1,373	1,098
akacetin	1,392	1,350	1,466	1,467	1,417	1,400	1,404	1,399	1,403	1,383	1,406	1,462	1,100	1,238	1,366	1,098	1,371	1,097
apigenin	1,391	1,351	1,466	1,467	1,415	1,401	1,403	1,400	1,402	1,384	1,407	1,462	1,100	1,238	1,366	1,098	1,371	1,098
krizin	1,388	1,352	1,460	1,462	1,418	1,404	1,400	1,403	1,399	1,385	1,410	1,464	1,100	1,245	1,362	1,099	1,371	1,097
krizin-dimetileter	1,391	1,350	1,467	1,466	1,421	1,396	1,408	1,396	1,405	1,385	1,403	1,464	1,100	1,238	1,371	1,098	1,377	1,097
diosmetin	1,392	1,350	1,466	1,467	1,417	1,400	1,404	1,400	1,403	1,384	1,406	1,463	1,100	1,237	1,366	1,098	1,371	1,097
flavon	1,388	1,353	1,462	1,471	1,404	1,389	1,400	1,389	1,407	1,386	1,403	1,464	1,100	1,240	1,103	1,100	1,101	1,099
luteolin	1,391	1,350	1,467	1,467	1,417	1,399	1,404	1,399	1,403	1,384	1,406	1,464	1,100	1,237	1,366	1,098	1,371	1,097
tangeretin	1,391	1,350	1,465	1,470	1,421	1,403	1,420	1,403	1,414	1,383	1,400	1,462	1,100	1,238	1,368	1,386	1,372	1,385
tektokrizin	1,391	1,350	1,467	1,467	1,417	1,398	1,407	1,397	1,404	1,384	1,405	1,464	1,100	1,237	1,367	1,098	1,376	1,097
3-OH-flavon	1,392	1,364	1,473	1,460	1,406	1,387	1,402	1,387	1,410	1,380	1,403	1,461	1,378	1,241	1,103	1,100	1,101	1,099
3,6-diOH-flavon	1,391	1,365	1,472	1,462	1,404	1,393	1,413	1,382	1,412	1,382	1,401	1,461	1,379	1,241	1,101	1,377	1,100	1,100
3,7-diOH-flavon	1,394	1,363	1,474	1,457	1,406	1,384	1,412	1,398	1,405	1,379	1,406	1,461	1,378	1,242	1,103	1,099	1,372	1,098
fisetin	1,393	1,363	1,474	1,457	1,406	1,384	1,412	1,398	1,405	1,379	1,406	1,461	1,378	1,242	1,103	1,099	1,372	1,098
galangin	1,396	1,361	1,479	1,455	1,418	1,398	1,405	1,399	1,404	1,377	1,407	1,460	1,377	1,239	1,366	1,098	1,370	1,097
izoramnetin	1,395	1,361	1,479	1,455	1,418	1,398	1,405	1,399	1,404	1,378	1,407	1,460	1,377	1,240	1,366	1,098	1,370	1,098
kvercetin	1,392	1,363	1,472	1,451	1,420	1,402	1,402	1,402	1,400	1,379	1,411	1,459	1,378	1,248	1,362	1,099	1,370	1,097
ramnetin	1,391	1,363	1,471	1,450	1,417	1,404	1,399	1,406	1,397	1,381	1,413	1,460	1,379	1,248	1,362	1,098	1,374	1,098
siringetin	1,391	1,363	1,471	1,450	1,418	1,403	1,401	1,403	1,399	1,380	1,412	1,461	1,379	1,248	1,362	1,099	1,370	1,098
daidzein	1,374	1,356	1,474	1,471	1,405	1,386	1,409	1,400	1,402	1,386	1,405	1,105	1,459	1,239	1,103	1,099	1,372	1,098
formononetin	1,374	1,356	1,475	1,471	1,407	1,384	1,412	1,398	1,404	1,385	1,403	1,104	1,459	1,239	1,104	1,099	1,372	1,098
genistein	1,371	1,355	1,473	1,465	1,418	1,405	1,399	1,403	1,397	1,386	1,411	1,105	1,460	1,245	1,362	1,099	1,370	1,098
prunetin	1,371	1,355	1,473	1,464	1,416	1,407	1,397	1,407	1,395	1,387	1,412	1,105	1,460	1,245	1,362	1,098	1,375	1,098
epikatehin	1,441	1,540	1,528	1,481	1,408	1,402	1,400	1,401	1,401	1,380	1,406	1,499	1,421	1,124	1,375	1,098	1,374	1,097

Tablica 19. Izračunane vrijednosti volumena (V_s), hidrofobnih konstanti (π_s) i relativnih masa (M_s) supstituenata.

Deskriptor / Flavonoid	V_s(R2)	π_s(R2)	M_s(R2)	V_s(R3)	π_s(R3)	M_s(R3)	V_s(R6)	π_s(R6)	M_s(R6)	V_s(R8)	π_s(R8)	M_s(R8)
hesperetin	100,86	0,61	33,62	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
homoeriodiktiol	100,86	0,53	33,62	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
izosakuranetin	103,61	1,57	32,09	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
pinocembrin	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
pinocembrin-7-metileter	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	37,15	–0,09	7,40
6-OH-flavon	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
7-OH-flavon	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56
akacetin	103,61	1,57	32,09	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
apigenin	78,26	0,98	27,25	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
krizin	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
krizin-dimetileter	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	37,15	–0,09	7,40	37,15	–0,09	7,40
diosmetin	100,86	0,61	33,62	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
flavon	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
luteolin	75,57	0,37	28,78	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
tangeretin	103,61	1,57	32,09	0,00	0,00	0,00	37,15	–0,09	7,40	37,15	–0,09	7,40
tektokrizin	80,88	1,76	25,73	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56	37,15	–0,09	7,40
3-OH-flavon	80,88	1,76	25,73	11,79	–0,74	2,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,6-diOH-flavon	80,88	1,76	25,73	11,79	–0,74	2,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,7-diOH-flavon	80,88	1,76	25,73	11,79	–0,74	2,56	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56
fisetin	75,57	0,37	28,78	11,79	–0,74	2,56	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56
galangin	80,88	1,76	25,73	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
izoramnetin	100,86	0,53	33,62	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
kvercetin	75,57	0,37	28,78	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
ramnetin	75,57	0,37	28,78	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
siringetin	148,43	0,79	44,82	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
daidzein	0,00	0,00	0,00	78,26	0,98	27,25	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56
formononetin	0,00	0,00	0,00	103,61	1,57	32,09	0,00	0,00	0,00	11,79	–0,74	2,56
genistein	0,00	0,00	0,00	78,26	0,98	27,25	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56
prunetin	0,00	0,00	0,00	78,26	0,98	27,25	11,79	–0,74	2,56	37,15	–0,09	7,40
epikatehin	75,57	0,37	28,78	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56	11,79	–0,74	2,56

Hijerarhijsko formiranje klastera i mehanizmi antiagregacijskog učinka

Na temelju reduciranog skupa molekulskih deskriptora kreirano je hijerarhijsko stablo – dendrogram, primjenom grafičkog Gaussovog modela u kombinaciji s višedimenzijskim ponovnim uzorkovanjem. Rezultat je prikazan na slici 13.



Slika 13. Dendrogram (hijerarhijski klasteri) temeljen na molekulskim deskriptorima istraživanih flavonoida. Udaljenost je temeljena na prosječnoj vrijednosti parcijalnog koeficijenta korelacije (*r*). Klasteri su numerirani i označeni sivom bojom. Vjerojatnost pouzdanosti čvora (*bp*) i pouzdanostipridruživanja (*au*) označeni su zelenom odnosno crvenom bojom. U crvenim pravokutnicima nalaze se statistički značajni (stabilni) klasteri s vrijednošću *au*> 95%.

Kako u skupu ima 30 flavonoida tako postoji (30–1) čvorova koji su označeni sivo u dendrogramu (slika 13). Uočava se pet stabilnih klastera 2, 5, 8, 18 i 24. Klastere 2 i 5 čine izoflavonoidi, koji se u kategoričkom vrednovanju zbog velikih vrijednosti *MINaAC* u ADPtestu svrstavaju u kategoriju inaktivnih spojeva. Stabilan klaster 18 čine visokoaktivni flavonoidi koji su kategorizirani u skupinu aktivnih zbog malih vrijednosti *MINaAC*. U klaster 8 svrstani su flavonoli kvercetin, njegovi metilirani derivati ramnetin i izoramnetin te metoksilirani derivatsiringetin. Flavanoni iz klastera 16 s epikatehinom čine stabilan klaster 24.

Klaster kojeg čine izoflavonoidi formononetin, daidzein, genistein i prunetin sugerira sličan mehanizam djelovanja što se potvrđuje i literaturnim podacima – djelovanje na cAMP, a u testu agregacije trombocita koja je potaknuta ADP-om ovi spojevi su se pokazali najmanje učinkoviti u odnosu na druge klase flavonoida.

Ostalim flavonoidima nije moguće eksplicitno predvidjeti mehanizam djelovanja (tablica 20), tim više što zajednički klaster tvore 3,6-dihidroksiflavon i 6-hidroksiflavon. 3,6-dihidroksiflavon može djelovati proagregacijski, zbog mogućnosti stvaranja semikinona odnosno kinona, za razliku od 6-hidroksiflavona. Navedeno je pokazano u testu agregacije trombocita koja je potaknuta arahidonskom kiselinom. Dobiveni rezultati u suglasju su s literaturnim podacima prikazanim u tablici 20.

Ovaj je način tvorbe klastera (učenje bez učitelja) pogodan za predviđanje jednostavnih mehanizama djelovanja baziranih na strukturnim karakteristikama molekula, ukoliko vrijednosti aktivnosti za veliku većinu molekula nisu poznate. Nedostatakje ovog pristupa kvaliteta kategoričke tablice 20, kojase temelji na literaturnim i eksperimentalnim podacima. U nekim slučajevima (npr. epikatehin), a prema podacima iz literature, neki su agregacijski testovi opisani kao negativni, a drugi kao pozitivni, što otežava kategorizaciju. Iako npr. kvercetin djeluje na velik broj meta, često u velikim koncentracijama postiže željeni učinak, u odnosu na one koje se mogu postići *in vivo*. U konačnici, velika je većina podataka za analizirane flavonoide nepoznata, a flavonoidi mogu iskazivati antiagregacijski učinak na više zahvatnih točaka ili pak nespecifičnim mehanizmom.

Tablica 20. Pregled mehanizama antiagregacijskog učinka flavonoida.[1]

Mehanizam djelovanja / Flavonoid	lipooksigenaza	ciklooksigenaza 1	ciklooksigenaza 2	tromboksan sintaza	antagonist TxA_2 receptora	fosfolipaza C	Syk-kinaza	Fin-kinaza	fosfodiesteraze	lipidni dvosloj	dušikov oksid	smanjenje ROS	smanjenje Ca^{2+}	COLtest	RISTOtest	TRAPtest	ADPtest	ASPItest
kvercetin	+	+			+	+	+	+	+	+	+			+			+	+
apigenin					+	+	+	+	+					+			+	+
hesperetin			+	–		+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
luteolin	+		+		+				+					+			+	+
epikatehin	+			+										+	+	+	+	–
3,6-diOH-flavon												–	+	+	+	+	+	–
6-OH-flavon														+	+	+	+	+
pinocembrin-7-metileter														+	+	+	+	–
genistein									+					+			+	+
diosmetin					+									+			+	+
daidzein									+								+	
prunetin									+								+	
flavon					+												+	
krizin					+			–									+	
akacetin					+												+	
izosakuranetin												–	–				+	
izoramnetin												–	–				+	

+ označava ostvarivanje, a – potvrđeniizostanak antiagregacijskog učinka navedenim mehanizmom djelovanja.
Crveno označeni podaci rezultat su vlastitih istraživanja.

[1] Tablica je pripremljena na osnovi literaturnog pregleda u odjeljku 1.4. Uvoda i rezultata vlastitih istraživanja.

Slučajna šuma i predviđanje antiagregacijskog učinka

QSAR modeliranje provedeno je metodom slučajne šume. Za testiranje postavljenog modela primijenjena je LOO metoda (Debeljak 2007.). Postupak se ponavlja 10 puta. Prosječna dobivena točnost modela iznosi 40,67%.

Isti se rezultat dobiva i iz matrice konfuzije (tablica 21). U 10 testiranja skupa od 30 flavonoida, njih je 122od 300 točnoklasificirano te točnost modela iznosi 122 / 300 = 40,67%.

Tablica 21. Matrica konfuzije QSAR modela koji je temeljen na metodi slučajne šume.

Zapaženo / **Predviđeno**	aktivan	inaktivan
aktivan	66	94
inaktivan	84	56

Osjetljivost je definirana kao mjera točno predviđenih pozitivnih rezultata i iznosi 44,00% (tj. 66 / (66 + 84)). Specifičnost je definirana kao mjera točno predviđenih negativnih rezultata, a iznosi 37,33% (tj. 56 / (56 + 94)). Parametri točnosti, osjetljivosti i specifičnosti pokazuju da je sposobnost predviđanja modela izrazito slaba.

Kada su za postavljanje QSAR modela primijenjeni samo globalni deskriptori, na cjelokupnom skupu flavonoida točnost predviđanja je bila 43,33%. Kako je riječ o malom poboljšanju modela, može se zaključiti da globalni deskriptori slabo opisuju antiagregacijski učinak flavonoida uz koeficijent determinacije 18,5% (Udovičić i sur. 2007.).

Zadržavanjem samo kvantnokemijskih deskriptora specifičnihza supstituente postignuta je srednja točnost predviđanja od 65%, pri čemu su iz originalnog skupa flavonoida uklonjeni strukturno znatno različiti izoflavonoidi. Ovaj podatak ukazuje na velik broj neinformativnih deskriptora u skupu od 131 deskriptora. Za povećanje točnosti predviđanja potrebno je poznavanje antiagregacijskog učinka znatno većeg broja flavonoida i/ili se QSAR analiza treba provoditi na klasama flavonoida koji imaju isti mehanizam djelovanja.

S obzirom na slabu točnost predviđanja modela te činjenicu da globalni i lokalni deskriptori opisuju samo 18%, odnosno 42% antiagregacijskog učinka flavonoida, odabir relevantnih

deskriptora nije proveden, iako metoda slučajne šume omogućuje rangiranje deskriptora. Stoga se može zaključiti da povećanjem broja deskriptora ne dolazi do poboljšanja predviđanja.

Obje metode učenja, bez učitelja (hijerarhijsko formiranje klastera) i s učiteljem (slučajna šuma), pokazale su proturječnu kategorizaciju flavonoida s poznatim mehanizmima djelovanja, odnosno slabopredviđanje antiagregacijske aktivnosti. Kako flavonoidi djeluju preko različitih meta i signalnih putova (tablica 20), odabrani skup nije prikladan, odnosno dovoljno velik i homogen za donošenje zaključaka o farmakoforima i predviđanje antiagregacijskog učinka.

Stoga je za postavljanje kvalitetnog QSAR modela s visokim postotkom predviđanja potrebno promijeniti skup deskriptora ili usmjeriti istraživanja na specifične ciljane mete, npr. cAMP fosfodiesterazu. Za dodatne provjere mehanizama djelovanja mogle bi se koristiti i nespecifične metode korištene u ovom radu. Međutim specifičnost predloženih metoda mogla bi se povećati primjenom specifičnih inhibitora signalnih putova, kao npr. kombinacijom s acetilsalicilnom kiselinom koja inhibira ciklooksigenazu u testu agregacije trombocita koja je potaknuta arahidonskom kiselinom.

Akhlaghi M, Bandy B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. J Mol Cell Cardiol 46(2009): 309–17.

Ancrenaz V, Daali Y, Fontana P, Besson M, Samer C, Dayer P, Desmeules J. Impact of genetic polymorphisms and drug-drug interactions on clopidogrel and prasugrel response variability. Curr Drug Metab 11(2010): 667–77.

Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. Proc Natl Acad Sci USA 96(1999): 11189–93.

Angiolillo DJ, Firstenberg MS, Price MJ, Tummala PE, Hutyra M, Welsby IJ, Voeltz MD, Chandna H, Ramaiah C, Brtko M, Cannon L, Dyke C, Liu T, Montalescot G, Manoukian SV, Prats J, Topol EJ. Bridging antiplatelet therapy with cangrelor in patients undergoing cardiac surgery: a randomized controlled trial. JAMA 307(2012): 265–74.

Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. BMJ 324(2002): 71–86.

Balaban AT. Highly Discriminating Distance-Based Topological Indeks. Chem Phys Lett 89(1982): 399–404.

Barbarić M, Mišković K, Bojić M, Lončar MB, Smolčić-Bubalo A, Debeljak Ž, Medić-Šarić M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. J Ethnopharmacol 135(2011): 772–8.

Biljan M, Dmitrović B, Kristek J, Šimundić A-M, Mandić S, Šerić V, Margaretić D, Debeljak Ž. Statistical Learning Confirms the Diagnostic Significance of the Anemia Panel in Breast Cancer. Clin Chem Lab Med 50(2012): u tisku.

Bojić M, Debeljak Ž, Medić-Šarić M, Tomičić M. Interference of selected flavonoid aglycons in platelet aggregation assays. Clin Chem Lab Med 50(2012): u tisku.

Bojić M, Debeljak Ž, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S. Evaluation of Antiaggregatory Activity of Flavonoid Aglycone Series. Nutr J 10(2011): 73.

Booth AN, Jones FT, DeEds F. Metabolic fate of hesperidin, eriodictyol, homoeriodictyol, and diosmin. J Biol Chem 16(1957): 661–8.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as Antioxidants, Determination of Radical Scaveninging Efficiencies. Methods Enzymol 186(1990): 343–7.

Brass L, Stalker TJ. Mechanisms of platelet activation. U: Gresele P, Fuster V, López JA, Page CP, Vermylen J, (urednici). Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. Cambridge: Cambridge University Press, 2008: 37–52.

Breiman L. Random Forests. Mach Learn 45(2001): 5–32.

Bretschneider E, Kaufmann R, Braun M, Nowak G, Glusa E, Schrör K. Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells. Br J Pharmacol 132(2001): 1441–6.

Bucki R, Pastore JJ, Giraud F, Sulpice JC, Janmey PA. Flavonoid inhibition of platelet procoagulant activity and phosphoinositide synthesis. J Thromb Haemost 1(2003): 1820–8.

Burda S, Oleszek W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. J Agric Food Chem 49(2001): 2774–9.

Calatzis A, Loreth RM, Spannagl M. Multiplate® platelet function analysis – application and interpretation. Munich: Dynabyte GmbH, 2006.

Calatzis A. Vollblutverfahren zur Erfassung der primären Hämostase. J Lab Clin Med 31(2007): 239–47.

Chang H, Lin H, Yi L, Zhu J, Zhou Y, Mi M, Zhang Q. 3,6-Dihydroxyflavone induces apoptosis in leukemia HL-60 cell via reactive oxygen species-mediated p38 MAPK/JNK pathway. Eur J Pharmacol 648(2010): 31–8.

Chaudhry Q, Piclin N, Cotterill J, Pintore M, Price NR, Chrétien JR, Roncaglioni A. Global QSAR models of skin sensitisers for regulatory purposes. Chem Cent J 4(2010): S5.

Chou DS, Lee JJ, Hsiao G, Hsieh CY, Tsai YJ, Chen TF, Sheu JR. Baicalein induction of hydroxyl radical formation via 12-lipoxygenase in human platelets: an ESR study. J Agric Food Chem 55(2007): 649–55.

Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptor signalling. Hematol J 3(2004): S159–63.

Cox D. Platelet pharmacology. U: Gresele P, Fuster V, López JA, Page CP, Vermylen J, (urednici). Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. Cambridge: Cambridge University Press, 2008: 341–66.

Cros AFA. Action de l'alcool amylique sur l'organisme. Strasbourg: University of Strasbourg, 1863.

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 31(2007): 1308–14.

Debeljak Ž. Matematički modeli u dizajnu antimikrobnog učinka 3,4-disupstituiranih kumarina. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2007.

Dell'Agli M, Maschi O, Galli GV, Fagnani R, Dal Cero E, Caruso D, Bosisio E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. Br J Nutr 99(2008): 945–51.

Deng H, Xiao H. The maximum Wiener polarity index of trees with k pendants. Appl Math Lett 23(2010): 710–15.

Dew TP, Day AJ, Morgan MR. Xanthine oxidase activity in vitro: effects of food extracts and components. J Agric Food Chem 53(2005): 6510–5.

Diudea MV, Gutman I, Lorentz J. Molecular Topology. Cluj-Napoca: Babes-Bolyai University, 2007.

Downs GM, Gillet VJ, Holliday JD, Lynch MF. Review of ring perception algorithms for chemical graphs. J Chem Inf Comput Sci 29(1989): 172–87.

Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. J Med Chem 43(2000): 3714–7.

Escolar G, White JG. The platelet open canalicular system: a final common pathway. Blood Cells 17(1991): 467–85.

Ferrara P, Apostolakis J, Caflisch A. Evaluation of a fast implicit solvent model for molecular dynamics simulations. Proteins 46(2002): 24–33.

Francetić I, i sur. Farmakoterapijski priručnik, 6. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 2010.

Freedman JE, Parker C III, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V, Deak LR, Iafrati MD, Folts JD. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. Circulation 103(2001): 2792–8.

Furusawa M, Tsuchiya H, Nagayama M, Tanaka T, Nakaya K, Iinuma M. Anti-platelet and membrane-rigidifying flavonoids in brownish scale of onion. J Health Sci 49(2003): 475–80.

Gasteiger J, Marsili M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. Tetrahedron 36(1980): 3219–28.

Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-García O, Vicente V, Rivera J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor. J Thromb Haemost 3(2005): 369–76.

Gutman I. A Formula for the Wiener Number of Trees and Its Extension to Graphs Containing Cycles, Graph Theory Notes New York, 27(1994): 9–15.

Han J, Kamber M. Data mining: Concepts and techniques. San Francisco: Morgan Kaufmann, 2001.

Harborne JB, Williams CA. Advances in Flavonoid Research Since 1992. Phytochemistry 55(2000): 481–504.

Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. J Cell Sci 122(2009): 159–63.

Havsteen B. Flavonoides, a Class of Natural Products of High Pharmacological Potency. Biochem Pharmacol 32(1983): 1141–8.

Havsteen BH. The biochemistry and chemical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics 96(2002): 67–202.

Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, Butler J, Dracup K, Ezekowitz MD, i sur. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. Circulation 123(2011): 933–44.

Hendrich AB. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. Acta Pharmacol Sin 27(2006): 27–40.

Heptinstall S, May J, Fox S, Kwik-Uribe C, Zhao L. Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent *in vitro* and *ex vivo* studies in healthy adults. J Cardiovasc Pharmacol 47(2006): S197–205.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. Nutr Cancer 20(1993): 21–9.

Hillman-Wiseman C. Laboratory Testing in Coagulation. U: McKenzie SB, Williams JL (urednici). Clinical Laboratory Hematology. 2. izdanje. New York: Pearson, 2010: 889–922.

Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am J Clin Nutr 62(1995): 1276–82.

Hsieh CH, Lu RH, Lee NH, Chiu WT, Hsu MH, Li YC. Novel solutions for an old disease: diagnosis of acute appendicitis with random forest, support vector machines, and artificial neural networks. Surgery 149(2011): 87–93.

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 2(2004): 2138–45.

Hwang SL, Yen GC. Modulation of Akt, JNK, and p38 activation is involved in citrus flavonoid-mediated cytoprotection of PC12 cells challenged by hydrogen peroxide. J Agric Food Chem 57(2009): 2576–82.

Ikeda Y, Matsubara Y, Kamata T. Platelet immunology: structure, functions, and polymorphism of membrane glycoproteins. U: Gresele P, Fuster V, López JA, Page CP, Vermylen J, (urednici). Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. Cambridge: Cambridge University Press, 2008: 341–66.

Isaacs NS. Physical Organic Chemistry. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1987.

Jackson SP. Arterial thrombosis-insidious, unpredictable and deadly. Nat Med 17(2011): 1423–36.

Jámbor C, Weber CF, Gerhardt K, Dietrich W, Spannagl M, Heindl B, Zwissler B. Whole blood multiple electrode aggregometry is a reliable point-of-care test of aspirin-induced platelet dysfunction. Anesth Analg 109(2009): 25–31.

Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, Katan MB. 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 67(1998): 255–62.

Jantan I, Raweh SM, Sirat HM, Jamil S, Mohd Yasin YH, Jalil J, Jamal JA. Inhibitory effect of compounds from Zingiberaceae species on human platelet aggregation. Phytomedicine 15(2008): 306–9.

Jasprica I, Mornar A, Debeljak Ž, Smolčić-Bubalo A, Medić-Šarić M, Mayer L, Romić Ž, Bućan K, Balog T, Sobočanec S, Šverko V. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. J Ethnopharmacol 110(2007): 548–54.

Jin YR, Han XH, Zhang YH, Lee JJ, Lim Y, Chung JH, Yun YP. Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. Atherosclerosis 194(2007): 144–52.

Jovanovic SV, Steenken S, Hara Y, Simic MG. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity? J Chem Soc Perkin Trans 2(1996): 2497–504.

Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. Semin Thromb Hemost 31(2005): 381–92.

Kalbantner K, Baumgarten A, Mischke R. Measurement of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. Vet J 185(2010): 144–51.

Kapetanović IM, Rosenfeld S, Izmirlian G. Overview of commonly used bioinformatics methods and their applications. Ann NY Acad Sc 1020(2004): 10–21.

Klamt A, Schüürmann G. COSMO: A New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and its Gradient. J Chem Soc Perkin Trans 2 2(1993): 799–805.

Kubinyi H. Changing Paradigms in Drug Discover. U:The Chemical Theatre of Biological Systems. Bozen: Beilstein-Institut, 2004.

Lee JH, Kim GH. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. J Food Sci 75(2010): H212–7.

Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. Nutr Res 28(2008): 729–37.

Liaw A, Wiener M. Classification and Regression by *randomForest*. R News 2(2002): 18–22.

Lill G, Voit S, Schrör K, Weber AA. Complex effects of different green tea catechins on human platelets. FEBS Lett 546(2003): 265–70.

Liu L, Xu DM, Cheng YY. Distinct effects of naringenin and hesperetin on nitric oxide production from endothelial cells. J Agric Food Chem 56(2008): 824–9.

Livingstone D. A Practical Guide to Scientific Dana Analysis. Chichester: A John Wiley & Sons, Ltd., Publication 2009.

Loke WM, Proudfoot JM, Hodgson JM, McKinley AJ, Hime N, Magat M, Stocker R, Croft KD. Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(2010): 749–57.

Luceri C, Giannini L, Lodovici M, Antonucci E, Abbate R, Masini E, Dolara P. p-Coumaric acid, a common dietary phenol, inhibits platelet activity *in vitro* and *in vivo*. Br J Nutr 97(2007): 458–63.

Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Fruit Phenolics. Boca Raton: CRC Press, 1990.

Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. Eur J Clin Nutr 57(2003): 235–42.

Masek A, Zaborski, M, Chrzescijanska, Ewa. Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry. Food Chemistry 127(2011): 699–704.

Mayo SL, Olafson BD, Goddard WA III. DREIDING: A Generic Force Field for Molecular Simulations. J Phys Chem 94(1990): 8897–909.

McCabe White M, Jennings LK. Platelet protocols. London: Academic Press, 1999.

McCullough ML, Peterson JJ, Patel R, Jacques PF, Shah R, Dwyer JT. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults. Am J Clin Nutr 95(2012): 454–64.

McFarland JW, Gans DJ. Cluster significance analysis contrasted with three other quantitative structure-activity relationship methods. J Med Chem 29(1986): 505–14.

Medić-Šarić M, Rastija V, Bojić M, Maleš Ž. From functional food to medicinal product: systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. Nutr J 8(2009): 33.

Michelson AD. Platelets. Amsterdam: Academic Press, 2002.

Miller KJ, Savchik JA. A new empirical method to calculate average molecular polarizabilities. J Am Chem Soc 101(1979): 7206–13.

Mruk JS, Webster MW, Heras M, Reid JM, Grill DE, Chesebro JH. Flavone-8-acetic acid (Flavonoid) profoundly reduces platelet-dependent thrombosis and vasoconstriction after deep arterial injury in vivo. Circulation 101(2000): 324–8.

Mulliken RS. A New Electroaffinity Scale; Together with Data on Valence States and on Valence Ionization Potentials and Electron Affinities. J Chem Phys 2(1934): 782–93.

Nakahata N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. Pharmacol Ther 118(2008): 18–35.

Navarro-Núñez L, Castillo J, Lozano ML, Martínez C, Benavente-García O, Vicente V, Rivera J. Thromboxane A2 Receptor Antagonism by Flavonoids: Structure-Activity Relationships. J Agric Food Chem 57(2009): 1589–94.

Neiva TJ, Morais L, Polack M, Simões CM, D'Amico EA. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. Phytother Res 13(1999): 597–600.

Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO. In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. Xenobiotica 28(1998): 389–401.

O'Malley BA. Primary Hemostasis. U: McKenzie SB, Williams JL (urednici). Clinical Laboratory Hematology. 2. izdanje. New York: Pearson, 2010: 612–38.

Ogunbayo OA, Harris RM, Waring RH, Kirk CJ, Michelangeli F. Inhibition of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase by flavonoids: a quantitative structure-activity relationship study. IUBMB Life 60(2008): 853–8.

Ollberding NJ, Lim U, Wilkens LR, Setiawan VW, Shvetsov YB, Henderson BE, Kolonel LN, Goodman MT. Legume, soy, tofu, and isoflavone intake and endometrial cancer risk in postmenopausal women in the multiethnic cohort study. J Natl Cancer Inst 104(2012): 67–76.

Orallo F, Alvarez E, Basaran H, Lugnier C. Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 370(2004): 452–63.

Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. Clin Chim Acta 235(1995): 207–19.

Padrón JA, Carrasco R, Pellón RF. Molecular descriptor based on a molar refractivity partition using Randic-type graph-theoretical invariant. J Pharm Pharm Sci 5(2002): 258–66.

Palmer DS, O'Boyle NM, Glen RC, Mitchell JB. Random forest models to predict aqueous solubility. J Chem Inf Model 47(2007): 150–8.

Parađiković N, Vinković T, Vinković Vrček I, Žuntar I, Bojić M, Medić-Šarić M. Effect of natural biostimulants on yield and nutritional quality: an example of sweet yellow pepper plants (Capsicum annuum L.). J Sci Food Agric 91(2011): 2146–52.

Pearson DA, Holt RR, Rein D, Paglieroni T, Schmitz HH, Keen CL. Flavanols and platelet reactivity. Clin Dev Immunol 12(2005): 1–9.

Peluso MR. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. Exp Biol Med 231(2006): 1287–99.

Peterson J, Dwyer J. Flavonoides: Dietary Occurrence and Biochemical Activity. Nutr Res 18(1998): 1995–2018.

Phang M, Lazarus S, Wood LG, Garg M. Diet and thrombosis risk: nutrients for prevention of thrombotic disease. Semin Thromb Hemost 37(2011): 199–208.

Pietta PG. Flavonoides as Antioxidantes. J Nat Prod 63(2000): 1035–42.

Pignatelli P, Di Santo S, Buchetti B, Sanguigni V, Brunelli A, Violi F. Polyphenols enhance platelet nitric oxide by inhibiting protein kinase C-dependent NADPH oxidase activation: effect on platelet recruitment. FASEB J 20(2006): 1082–9.

Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A, Lenti L, Ghiselli A, Gazzaniga PP, Violi F. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. Am J Clin Nutr 72(2000): 1150–5.

Platelet Function. http://www.platelet-research.org/3/mechanisms.htm pristupljeno: 1.3.2012.

Platt JR. Influence of Neighbor Bonds on Additive Bond Properties in Parafins. J Chem Phys 15(1947): 419–20.

Plavšić D, Nikolić S, Trinajstić N, Mihalić Z. On the Harary Index for the Characterization of Chemical Graphs. J Math Chem 12(1993): 235–50.

Polagruto JA, Gross HB, Kamangar F, Kosuna K, Sun B, Fujii H, Keen CL, Hackman RM. Platelet reactivity in male smokers following the acute consumption of a flavanol-rich grapeseed extract. J Med Food 10(2007): 725–30.

Polette A, Lemaitre D, Lagarde M, Véricel E. N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. Thromb Haemost 75(1996): 945–9.

Randić M. Novel Molecular Description for Structure-Property Studies. Chem Phys Lett 211(1993): 478–83.

Randić M. On Characterization of Molecular Branching. J Amer Chem Soc 97(1975): 6609–15.

Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). Regulativa (EC) broj 1907/2006 Europskog parlamenta i Vijeća (18.12.2006.).

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. Free Radical Bio Med 20(1996): 933–56.

Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V. Platelet receptors and signalling in the dynamics of thrombus formation. Haematologica 94(2009): 700–11.

Robbins RJ. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Metodology. Food Chem 51(2003): 2866–87.

Roma G, Braccio MD, Carrieri A, Grossi G, Leoncini G, Grazia Signorello M, Carotti A. Coumarin, chromone, and 4(3H)-pyrimidinone novel bicyclic and tricyclic derivatives as antiplatelet agents: synthesis, biological evaluation, and comparative molecular field analysis. Bioorg Med Chem 11(2003): 123–38.

Saija A, Scalese M, Lanza M, Marzullo D, Bonina F, Castelli F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. Free Radic Biol Med 19(1995): 481–6.

Scior T, Medina-Franco JL, Do QT, Martínez-Mayorga K, Yunes Rojas JA, Bernard P. How to recognize and workaround pitfalls in QSAR studies: a critical review. Curr Med Chem 16(2009): 4297–313.

Selassie CD. History of Quantitative Structure-Activity Relationships. U: Abraham DJ, (urednik). Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. 6. izdanje, Drug Discovery. Hoboken: John Wiley&Sons, Inc, 2003, 1–48.

Shantsila E, Watson T, Lip GYH. Laboratory investigation of platelets. U: Gresele P, Fuster V, López JA, Page CP, Vermylen J, (urednici). Platelets in hematologic and cardiovascular disorders. Cambridge: Cambridge University Press, 2008: 124–46.

Shimodaira H. Approximately unbiased tests of regions using multistep-multiscale bootstrap resampling. Ann Stat 32(2004): 2616–41.

Sibbing D, Schulz S, Braun S, Morath T, Stegherr J, Mehilli J, Schömig A, von Beckerath N, Kastrati A. Antiplatelet effects of clopidogrel and bleeding in patients undergoing coronary stent placement. J Thromb Haemost 8(2010): 250–6.

Silbernagl S, Lang F. Fundamentals: Abnormalities of Intracellular Signal Transduction. U: Silbernagl S, Lang F (urednici). Color Atlas of Pathophysiology. New York: Thieme, 2000: 6–9.

Stalmach A, Mullen W, Steiling H, Williamson G, Lean ME, Crozier A. Absorption, metabolism, and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. Mol Nutr Food Res 54(2010):323–34.

Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH. Green tea, the "Asian paradox," and cardiovascular disease. J Am Coll Surg 202(2006): 813–25.

Svetnik V, Liaw A, Tong C, Culberson JC, Sheridan RP, Feuston BP. Random forest: a classification and regression tool for compound classification and QSAR modeling. J Chem Inf Comput Sci 43(2003): 1947–58.

Sweetman S. Martindale: The Complete Drug Reference. London: Pharmaceutical Press, 2011.

Tempfer CB, Bentz EK, Leodolter S, Tscherne G, Reuss F, Cross HS, Huber JC. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. Fertil Steril 87(2007): 1243–9.

Thomas S. Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. Clin Lab 48(2002): 247–62.

Todeschini R, Consonni V. Handbook of Molecular Descriptors. Weinheim: Wiley-VCH, 2000.

Trinajstić N. Chemical Graph Theory. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1993.

Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? Biochem Med 17(2007): 10–15.

Vibes J, Lasserre B, Gleye J, Declume C. Inhibition of thromboxane A2 biosynthesis in vitro by the main components of Crataegus oxyacantha (Hawthorn) flower heads. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 50(1994): 173–5.

Vinković Vrček I, Bojić M, Žuntar I, Mendaš G, Medić-Šarić M. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. Food Chem 124(2011): 354–61.

Violi F, Pignatelli P, Pulcinelli FM. Synergism among flavonoids in inhibiting platelet aggregation and H_2O_2 production. Circulation 105(2002): E53.

Viswanadhan VN, Ghose AK, Revankar GR, Robins RK. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. J Chem Inf Comput Sci 29(1989): 163–72.

Walle T. Apsorption and Metabolism of Flavonoid. Free Rad Biol Med 36(2004): 829–37.

Wedick NM, Pan A, Cassidy A, Rimm EB, Sampson L, Rosner B, Willett W, Hu FB, Sun Q, van Dam RM. Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. Am J Clin Nutr 95(2012): *u tisku*.

Weng JR, Chan SC, Lu YH, Lin HC, Ko HH, Lin CN. Antiplatelet prenylflavonoids from Artocarpus communis. Phytochemistry 67(2006): 824–9.

Wiener H. Structural Determination of Paraffin Boiling Points. J Amer Chem Soc 69 (1947): 17–20.

Wright B, Moraes LA, Kemp CF, Mullen W, Crozier A, Lovegrove JA, Gibbins JM. A structural basis for the inhibition of collagen-stimulated platelet function by quercetin and structurally related flavonoids. Br J Pharmacol 159(2010): 1312–25.

Zhokhova NI, Palyulin VA, Baskin II, Zefirov AN, Zefirov NS. Fragment descriptors in the QSPR method: Their use for calculating the enthalpies of vaporization of organic substances. Russ J Phys Chem A 81(2007): 9–12.

Mirza jeBojić rođen 19. rujna 1981. godine u Slavonskom Brodu. Osnovnu i srednjoškolsku naobrazbu stekao je u Bosanskom Brodu, Crikvenici i Zagrebu. Godine 2000. nakon završene XV. gimnazije (MIOC), upisuje studij farmacije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirao je 2006. godine među deset najboljih studenta. Kao apsolvent, radio je u osiguranju kvalitete nutraceutika (Santo Ângelo, Brazil) i na registraciji lijekova (Beč, Austrija).

Od 2007. godine radi na Zavodu za farmaceutsku kemiju kao asistent i znanstveni novak na projektu „Biološki aktivni spojevi, metaboliti i QSAR“ voditeljice prof. dr. sc. M. Medić-Šarić.

Stručno se usavršavao na području tekućinskekromatografije visoke djelotvornosti (2008. god., Torun, Poljska), tankoslojnekromatografije (2009. god., Basel, Švicarska) i QSAR-a (2009. god., Oxford, Engleska).

Nastavni rad na Zavodu za farmaceutsku kemiju obuhvaća kolegije: Farmaceutska kemija 1, Biokemija lijekova, Biokemijske osnove toksičnosti endobiotika i ksenobiotika i Dizajniranje novih lijekova integriranog preddiplomskog i diplomskog studija farmacije. Suradnik je u nastavi na kolegijima: Osiguranje kvalitete i registracija lijekova, Vitamini i minerali u metaboličkim reakcijama (poslijediplomskog specijalističkog studija Fitofarmacija s dijetoterapijom) i Metabolizam lijekova i toksičnost (poslijediplomskog specijalističkog studija Klinička farmacija).

Kao koautor objavio je 11 znanstvenih radova, od čega 10 citira *CurrentContents*, 30 kongresnih priopćenja i 2 stručna rada. Održao je predavanje iz teme disertacije na 5. kongresu farmacije u Ohridu, Makedonija (2011. god.) te jedno predavanje u sklopu Sekcije za farmaceutske znanosti Hrvatskog farmaceutskog društva.

Stručni ispit, propisan za magistre farmacije, položio je 2011. god. pri Ministarstvu zdravstva i socijalne skrbi, RH. Član je Hrvatskog farmaceutskog društva, Hrvatske ljekarničke komore i Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa, Sekcije za kromatografiju.

Popis objavljenih znanstvenih radova citiranih u *CurrentContentsu*

1. Bojić M, Debeljak Ž, Medić-Šarić M, Tomičić M. Interferenceofselectedflavonoidaglyconsinplateletaggregationassays. ClinChemLab Med 50(2012): *u tisku*.
2. Barbarić M, Mišković K, Bojić M, Baus Lončar M, Smolčić-Bubalo A, Debeljak Ž, Medić-Šarić M. Chemical compositionoftheethanolicpropolisextractsanditseffect on HeLacells. J Ethnopharmacol 135(2011): 772–8.
3. Bojić M, Debeljak Ž, Tomičić M, Medić-Šarić M, Tomić S. EvaluationofAntiaggregatoryActivityofFlavonoidAglyconeSeries. Nutr J 10(2011): 73.
4. Medić-Šarić M, Rastija V, Bojić M. RecentAdvancesintheApplicationofHigh-PerformanceLiquidChromatographyintheAnalysisofPolyphenolsinWineandPropolis. J AOAC Int 94(2011): 32–42.
5. Parađiković N, Vinković T, Vinković Vrček I, Žuntar I, Bojić M, Medić-Šarić M. Effectofnaturalbiostimulants on yieldandnutritionalquality: anexampleofsweetyellowpepperplants (Capsicumannuum L.). J SciFoodAgr 91(2011): 2146–52.
6. Vinković Vrček I, Bojić M, Žuntar I, Mendaš G, Medić-Šarić M. Phenolcontent, antioxidantactivityand metal compositionofCroatianwinesderivingfromorganicallyandconventionallygrowngrapes. FoodChem 124(2011): 354–61.
7. Vinković Vrček I, Samobor V, Bojić M, Medić-Šarić M, Vukobratović M, Erhatić R, Horvat D, Matotan Z. Theeffectofgrafting on theantioxidantpropertiesoftomato (Solanumlycopersicum L.). Span J AgrRes 9(2011): 844–51.
8. Maleš Ž, Kremer D, Gašpar Randić Z, Randić M, HazlerPilepić K, Bojić M. QuantitativeAnalysisofGlucofrangulinsandPhenolicCompoundsinCroatianRhamnusandFrangulaSpecies. Acta BiolCracSerBot 52(2010): 108–13.
9. Medić-Šarić M, Rastija V, Bojić M, Maleš Ž. Fromfunctionalfood to medicinalproduct: Systematicapproachinanalysisofpolyphenolicsfrompropolisandwine. Nutr J 8(2009): 33.

10. Jasprica I, Bojić M, Mornar A, Bešić E, Bućan K, Medić-Šarić M. Evaluationofantioxidativeactivityof Croatianpropolissamplesusing DPPH$^{\bullet}$and ABTS$^{\bullet+}$stablefreeradicalassays. Molecules 12(2007): 1006–21.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

LABORATORIJSKO ISPITIVANJE I RAČUNALNO SIMULIRANJE ANTIAGREGACIJSKOG UČINKA POLIFENOLA

Mirza Bojić

SAŽETAK

Među prirodnim spojevima prisutnim u svakodnevnoj prehrani, flavonoidi su pokazali povoljan učinak u prevenciji kardiovaskularnih bolesti koji se, barem djelomično, može pripisati antiagregacijskom učinku. S obzirom na farmakološki interes, u potrazi za antitrombocitnim lijekovima, potrebna je sustavna eksperimentalna procjena antiagregacijskog učinka flavonoida. Takvi podaci mogli bi služiti za QSAR modeliranje antiagregacijskog učinka, istraživanje signalnih putova i procjenu utjecaja na *invitro* testove agregacije trombocita.

Skup od trideset flavonoida, odabran je za procjenu antiagregacijskog učinka, na uzorcima pune krvi pomoću Multiplate® funkcionalnog analizatora (Dynabyte, Njemačka) i ADP-a (ADPtest) kao slabog agonistaagregacije. Pet učinkovitih flavonoida iz ADPtesta je analizirano s četiri dodatna agonistaagregacije (arahidonska kiselina, kolagen, ristocetin i TRAP-6). Za računalno simuliranje antiagregacijskog učinka, generirano je 155 molekulskih deskriptora koji opisuju fizikalno-kemijska, odnosno globalna svojstva molekula i supstituenata. Od računalnih metoda za procjenu mehanizama djelovanja primijenjeno je hijerarhijsko formiranje klasteravišedimenzijskim ponovnim uzorkovanjem. Slučajna šuma, metoda statističkog učenja, korištena je za QSAR modeliranje.

Laboratorijski rezultati su iskazani kao minimalna koncentracija flavonoida koja dovodi do statistički značajnog smanjenja agregacije trombocita u odnosu na netretirani uzorak (minimalna antiagregacijska koncentracija – *MINaAC*). *MINaAC*flavonoida, u pojedinim testovima agregacijekoja je potaknuta ADP-om, kolagenom, TRAP-6 i ristocetinom, bila je u sljedećim rasponima: 0,12–122,07 μM; 15,26–244,14 μM; 15,26–122,07 μM i 0,06–15,26 μM. U testu agregacije trombocita koja je potaknuta arahidonskom kiselinom, proagregacijski učinak je zapažen kod pinocembrin-7-metiletera, epikatehina, hesperetina i 3,6-dihidroksiflavona. Literaturni su podaci bili nedostatni za interpretaciju rezultata dobivenih tvorbom hijerarhijskih klastera uslijed raznolikih mehanizama djelovanja pojedinih flavonoida. Validacija predviđanja učinka koja se temelji na metodi slučajne šume, rezultirala je niskom točnošćupredviđanja od 40,67%.

Mjerljivantiagregacijski učinak, na submikromolarnoj razini koncentracija flavonoida, sugerira da i svakodnevna konzumacija flavonoida prehranom može utjecati na *in vivo*agregaciju trombocita, što ukazuje i na njihovu moguću terapijsku primjenu. Temeljem antiagregacijskih testova s različitim induktorima agregacije, može se zaključiti da flavonoidi interferiraju s *invitro*agregacijom trombocita, ili antiagregacijski ili proagregacijski, što može utjecati na interpretaciju testova agregacije trombocita na punoj krvi. Razvoj pouzdanog QSAR modela onemogućuju raznovrsni mehanizmi djelovanja flavonoida kojima se ostvaruje antiagregacijski učinak. Stoga se daljnja istraživanja trebaju usmjeriti na pojedinačne mete i na povećanje broja analiziranih supstancija.

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

Rad sadrži: 110stranica, 13slika, 21tablica i 146literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi: flavonoidi, antiagregacijski učinak, trombociti, QSAR modeliranje.
Mentori: **dr. sc. Marica Medić-Šarić**, *redovita profesorica,Sveučilište u Zagrebu,Farmaceutsko-biokemijski fakultet*
dr. sc. Željko Debeljak, *naslovni docent,Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet.*
Ocjenjivači: **dr. sc. Željan Maleš**, *redoviti profesor,Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet*
dr. sc. Marica Medić-Šarić, *redovita profesorica,Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet*
dr. sc. Željko Debeljak, *naslovni docent,Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet*
dr. sc. Renata Zadro, *redovita profesorica,Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet*
dr. sc. Bono Lučić, *višiznanstveni suradnik, Institut Ruđera Boškovića, Zagreb.*
Rad prihvaćen:23. svibnja 2012.

BASIC DOCUMENTATION

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

EXPERIMENTAL DETERMINATION AND COMPUTATIONAL DESIGN OF ANTIAGGREGATORY EFFECT OF POLYPHENOLICS

MirzaBojić

SUMMARY

Among natural compounds, present in every day diet, flavonoids have shown beneficial effect in prevention of cardiovascular diseases that can be attributed, at least partially, to their antiaggregatory activity. Due to the ever increasing pharmacological interest in antiplatelet agents, a systematic experimental evaluation of large flavonoid series is needed. This will serve as possible data set for QSAR modeling of antiaggregatory activity, assessment of signaling pathways and evaluation of the *in vitro* effects of flavonoids on platelet aggregation in whole blood.

A set of thirty flavonoid aglycones was selected for the evaluation. Aggregation measurements were performed on the whole blood samples with multiple platelet functional analyzer (Dynabyte, Germany) and adenosine diphosphate (ADPtest) as a weak agonist of aggregation. Five potent flavonoids from the ADPtest were further analyzed using the four additional aggregation inducers (arachidonic acid, collagen, ristocetin and TRAP-6). Computational design of antiaggregatory effect was based on 155 molecular descriptors of physical and chemical properties; global properties of molecule and substituents. Method for the assessment of the possible mechanisms of action used was hierarchical clustering with multiscale bootstrap resampling. Random forest, a statistical learning method, was used for QSAR modeling.

Laboratory results were expressed as minimal concentration of flavonoid that can significantly lower the platelet aggregation compared to the corresponding untreated sample (minimal antiaggregatory concentration – *MINaAC*). *MINaAC* of flavonoids in individual tests were reported in the following ranges: 0.12–122.07 μM; 15.26–244.14 μM; 15.26–122.07 μM; and 0.06–15.26 μM for ADP, collagen, TRAP-6 and ristocetin aggregation-inducers, respectively. When arachidonic acid was used for induction of platelet aggregation, a proaggregatory effect was observed for pinocembrin-7-methylether, epicatechin, hesperetin and 3,6-dihydroxyflavone. Literature data was inconclusive for proper interpretation of hierarchical clustering due to different mechanism by which flavonoids achieve antiaggregatory effect. Validation of random forest prediction model resulted in 40.67% accuracy.

Measurable antiplatelet activity established at submicromolar flavonoid concentrations suggests that even a dietary consumption of some flavonoids can make an impact on *in vivo* aggregation of platelets. These findings also point out a therapeutic potential of some flavonoids. Based on the test with different agonists of aggregation it can be concluded that flavonoids interfere with *in vitro* platelet aggregation assays exhibiting either anti- or pro-aggregatory influencing the interpretation of the results of platelet aggregation. Development of reliable QSAR model under described settings is not possible due to different mechanisms responsible for antiaggregatory effect. Further studies should focus on specific targets; number of the analyzed substances should be increased.

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

Thesis includes: 110 pages, 13 figures, 21 tables and 146 references. Original is in Croatian language.
Keywords: flavonoidis, antiaggregatory effect, platelets, QSARmodeling.
Supervisors: **MaricaMedić-Šarić, PhD**, *Full Professor,University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
ŽeljkoDebeljak, PhD, *Assistant Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry*.
Reviewers: **ŽeljanMaleš, PhD**, *Full Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
MaricaMedić-Šarić, PhD, *Full Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
ŽeljkoDebeljak, PhD, *Assistant Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
RenataZadro, PhD, *Full Professor, University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry*
Bono Lučić, PhD, *Research Scientist,Institute RuđerBošković, Zagreb*.
The thesis accepted:May 23, 2012