



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Татјана М. Јурић

**ИСПИТИВАЊЕ БИЉНИХ ВРСТА *Alchemilla vulgaris* L. И
Satureja hortensis L.: ФИТОХЕМИЈСКИ ПРОФИЛ И
БИОЛОШКА АКТИВНОСТ У *IN VITRO* И *IN VIVO* УСЛОВИМА**

Докторска дисертација

Ментор: доц. др Владимир Михаиловић

Крагујевац, 2020. године



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Tatjana M. Jurić

**THE INVESTIGATION OF PLANT SPECIES *Alchemilla vulgaris*
L. AND *Satureja hortensis* L.: PHYTOCHEMICAL PROFILE
AND BIOLOGICAL ACTIVITY UNDER *IN VITRO* AND *IN*
VIVO CONDITIONS**

Ph.D. Thesis

Supervisor: Dr. Vladimir Mihailović, Assistant Professor

Kragujevac, 2020.

I Аутор

Име и презиме: **Татјана М. Јурић**

Датум и место рођења: **04.12.1989. Нови Сад**

Садашње запослење: **истраживач сарадник, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду**

II Докторска дисертација

Наслов: **Испитивање биљних врста *Alchemilla vulgaris* L. и *Satureja hortensis* L.: фитохемијски профил и биолошка активност у *in vitro* и *in vivo* условима**

Број страница: **226**

Број слика: **39**, Број схема: **26**, Број табела: **17**

Број библиографских јединица: **468**

Установа и место где је израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област: (УДК): **54 (Хемија), 577.1 (Биохемија)**

Ментор: **др Владимир Михаиловић**, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу

III Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: IV-01-837/16, од 14.9.2016. године

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену подобности теме и кандидата:

1. **др Владимир Михаиловић**, научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, научна област: Хемија;
2. **др Гвозден Росић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија;
3. **др Данијела Мишић**, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду, научна област: Физиологија биљака;
4. **др Милан Младеновић**, доцент Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија.

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. **др Гвозден Росић**, редовни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија
2. **др Борис Поповић**, редовни професор, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, ужа научна област: Хемија и биохемија
3. **др Ненад Вуковић**, ванредни професор, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Биохемија
4. **др Јелена С. Катанић Станковић**, научни сарадник, Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу, Научна област: Хемија
5. **др Драгица Селаковић**, доцент, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Физиологија

Датум одбране докторске дисертације: 2020. година

Ментор докторске дисертације

др Владимир Михаиловић, доцент
Природно-математички факултет
Универзитет у Крагујевцу

Чланови Комисије

др Гвозден Росић, редовни професор
Факултет медицинских наука
Универзитет у Крагујевцу

др Борис Поповић, редовни професор
Пољопривредни факултет
Универзитет у Новом Саду

др Ненад Вуковић, ванредни професор
Природно-математички факултет
Универзитет у Крагујевцу

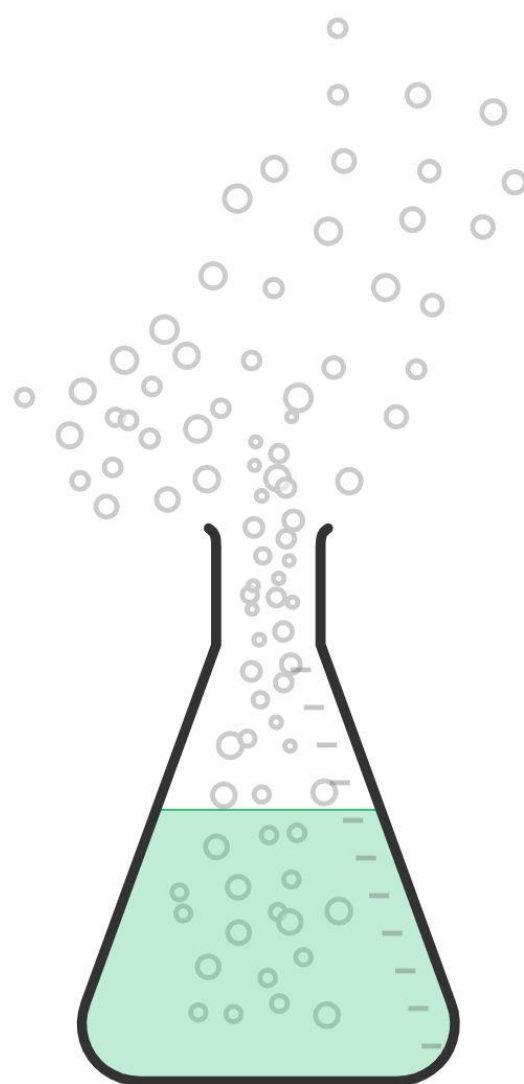
др Јелена С. Катанић Станковић, научни сарадник
Институт за информационе технологије Крагујевац
Универзитет у Крагујевцу

др Драгица Селаковић, доцент
Факултет медицинских наука
Универзитет у Крагујевцу

Знање је светлост која осветљава наш пут кроз живот.

Михајло Пупин

Предговор



Експериментални део ове докторске дисертације је реализован у Лабораторији за биохемију и хемију природних производа Природно-математичког факултета у Крагујевцу у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ИИИИ43004). Део истраживања спроведен је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (Катедра за физиологију и Катедра за патологију), Институту за фармацеутске науке Универзитета Карл Франц у Грацу (Катедра за фармакогнозију), Институту за биолошка истраживања "Синиша Станковић" Универзитета у Београду и на Универзитету Федерико II у Напуљу (Департман за хемијске науке). Користим ову прилику да се обратим свима који су дали свој допринос приликом израде ове докторске дисертације.

Изузетно ми је задовољство што могу да упутим велико ХВАЛА свом ментору, доц. др Владимиру Михаиловићу, на свим професионалним и људским саветима током претходних година, на мојим првим истраживачким корацима и обликовању мог научног рада, усмеравању ка циљу и на подршци током израде ове дисертације. Научном сараднику, др Јелени С. Катанић Станковић, бескрајно сам захвална за сваку колегијалну реч, стручни савет и позитиван приступ од првог дана мог боравка у Лабораторији за биохемију ПМФ-а у Крагујевцу. Проф. др Борису Поповићу дугујем неизмерну захвалност на прилици да се усавршавам и радим посао који бескрајно волим. Хвала за сталну покретачку енергију, радни елан и свакодневну истраживачку инспирацију. Велику захвалност дугујем проф. др Гвоздену Росићу на жељи за спровођењем експеримената у *in vivo* условима и на отварању нових, мени до тада непознатих, научних поља. Хвала доц. др Драгици Селаковић на показаној вољи да се реализују нова истраживања, на пријатној атмосфери и изузетној колегијалности у свим етапама израде ове дисертације. Желим да се захвалим и проф. др Ненаду Вуковићу на вредним сугестијама током мојих докторских студија, као и на брзом прегледању рукописа дисертације.

Захваљујем се и: др Јовани Јоксимовић са Катедре за физиологију Факултета медицинских наука у Крагујевцу, за свесрдну помоћ приликом спровођења *in vivo* експеримената; проф. др Весни Станковић са Факултета медицинских наука у Крагујевцу, за хистопатолошке анализе ткивних исечака; проф. др Милану С. Станковићу (Департман за биологију и екологију, ПМФ Крагујевац), за сакупљање и детерминацију биљног материјала; истраживачкој групи са Катедре за фармакогнозију (Универзитет Карл Франц у Грацу) на челу са проф. др Рудолфом Бауером, у чијој лабораторији су извршени експерименти испитивања антиинфламаторне активности; др Данијели Мишић (Институт за биолошка

истраживања "Синиша Станковић") за спроведене UHPLC анализе екстраката, др Дарији Марији Монти (Универзитет Федерико II у Напуљу), за реализацију тестова биокомпатибилности биљних екстраката; Министарству просвете, науке и технолошког развоја, захваљујући чијој стипендији је ова докторска дисертација успешно реализована. Хвала мојим колегама из Лабораторије за биохемију ПМФ-а у Крагујевцу на пријатним тренуцима које сам доживела током рада на овој тези. Мојим колегама на предметима Хемија и Биохемија на Пољопривредном факултету у Новом Саду бескрајно сам захвална за свакодневни смех, срдачне разговоре и безрезервну подршку током писања ове тезе. Хвала мојим студентима, јер су ми омогућили да растем као хемичар и никада не престанем да учим и сазнајем.

На крају, а ипак у основи и на почетку свега - хвала мојој породици - родитељима, јер су ми пружили ослонац и дали крила и снагу да следим своје снове и развијам своје потенцијале; секи, за непресушну веру у мене и речи охрабрења када је било најтеже, као и искрено радовање сваком мом успеху; и супругу, за велико разумевање мојих амбиција и пута који сам изабрала и подршку од почетка мојих студентских дана. Ви сте извор моје снаге и разлог због којег сваки успех има смисао.

У Новом Саду и Крагујевцу, 2020. године

Аутор

РЕЗИМЕ

Предмет ове докторске дисертације била су фитохемијска и фармаколошка испитивања биљних врста *Alchemilla vulgaris* L. (фамилија Rosaceae) и *Satureja hortensis* L. (фамилија Lamiaceae), које су препознате као лековите у традиционалној медицини, али су експериментални подаци о њиховом хемијском саставу и биолошкој активности оскудни. Циљеви ове студије били су да се поменуте биљне врсте хемијски окарактеришу и да се процене њихови биолошки одговори у *in vitro* и *in vivo* условима.

Применом хроматографије високих перформанси (UHPLC-DAD/(-)HESI-MS/MS) показано је да су метанолни екстракти надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis* богати фенолним једињењима, пре свега фенолним киселинама и флавоноидима. Елагинска киселина представља доминантно једињење у екстракту надземног дела *A. vulgaris*, док је најзаступљенија компонента екстракта корена исте биљке катехин-галат. Рузмаринска киселина, присутна у концентрацији 24,9 mg/g сувог екстракта, је једињење у највећем проценту присутно у екстракту *S. hortensis*, у односу на остала идентификована једињења из групе полифенола. Поред ових једињења, у анализираним екстрактима идентификоване су и веће количине флавона, флаванона, флаванола и њихових деривата. Путем спектрофотометријских анализа, у екстрактима је одређен садржај укупних фенолних једињења, као и појединих класа полифенола. Резултати показују да су испитивани екстракти веома богати укупним фенолним једињењима и да, апроксимативно, чине скоро више од трећине екстракта. Посебно се издвајају количине кондензованих танина и фенолних киселина, док је садржај мономерних и укупних антоцијана у сва три екстракта био веома низак.

У циљу процене антиоксидативне активности, примењено је више различитих антиоксидативних тестова у *in vitro* условима. Добијени резултати показали су да се екстракти одликују високом укупном антиоксидантивном активношћу. Уз то, ова три екстракта су показала висок степен неутрализације DPPH и OH радикала, ABTS радикал катјона и инхибиције стварања липидних пероксида при IC₅₀ вредностима нешто нижим или у рангу оних добијених за добро познате природне (елагинска киселина и катехин) и синтетске антиоксиданте (бутиловани хидрокситолуен (БХТ)). Поред тога, екстракти су показали и способност редукције фери јона, Fe³⁺, до феро облика гвожђа, Fe²⁺. Међутим, ни један од три анализирана узорка не показује способност хелирања јона метала.

Могућност примене екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis* као антимикробних агенаса испитивана је применом микродилуционе методе на девет сојева бактерија, девет сојева плесни и једном квасцу. Вредности за минималне инхибиторне концентрације (МИК) екстраката биле су у распону од 0,156 - 5 mg/mL за екстракт надземног дела *A. vulgaris*, односно 0,156 - 10 mg/mL за корен *A. vulgaris* и надземни део *S. hortensis*. Бактеријски сојеви три Грам негативне бактерије: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Azotobacter chroococcum*, показали су се најрезистентнијим на деловање екстраката (МИК = 2,5 - 10 mg/mL). При концентрацијама доста нижим од поменутих, екстракти инхибирају раст појединих Грам позитивних бактерија (*Micrococcus lysodeikticus*, *Enterococcus faecalis* и *Bacillus mycoides*). Супротно овим вредностима, екстракти готово да не испољавају антифунгално деловање, будући да се инхибиторни ефекат на раст плесни испољава тек при концентрацијама вишим од 2,5 mg/mL.

Антиинфламаторно деловање екстраката испитивано је ензимским имуноесејем, којим се пратила активност циклооксигеназе-1 (COX-1) и циклооксигеназе-2 (COX-2). Од три анализирана узорка, екстракт *S. hortensis* у примењеној концентрацији од 50 µg/mL се показао као ефикаснији у супресији ензимске активности обе изоформе циклооксигеназе (60,94% за COX-1 и 70,66% за COX-2) у односу на екстракте *A. vulgaris*, примењене у истој концентрацији. На нивоу COX-1, екстракти *A. vulgaris* испољавају скоро приближно исти степен инхибиције ензимске активности (око 45%), док се разлика уочава код COX-2, где се екстракт надземног дела показао као ефикаснији (63,56%) у односу на корен (40,72%). Резултати су показали да екстракт *S. hortensis* инхибира експресију гена за COX-2 путем нарушавања Nf-κB сигналног пута (19,18%), за разлику од екстраката *A. vulgaris*, за које добијена негативна вредност за експресију гена за COX-2 указује на механизам који не укључује Nf-κB.

У циљу испитивања безбедности примене екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis*, вршено је тестирање биокомпатибилности ових узорака са здравим ћелијама хуманих кератиноцита и фибробласта миша. Добијени резултати недвосмислено указују да су испитивани екстракти безбедни и да њихова примена не води нарушавању пролиферације и метаболичке активности здравих ћелија.

Како се антиоксидативно деловање екстраката показало као најизраженије, даља *in vivo* испитивања екстраката су имала за циљ да се ова активност, по први пут, додатно испита на смањењу оксидативног оштећења изазваног цисплатином у ткиву јетре, бубрега и тестиса.

Резултати су потврдили да примена екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis* води реперацији оштећеног ткива и то: нормализацијом нивоа параметара серума који сведоче о очуваности функција поменутих органа, поновним успостављањем редокс хомеостазе самом ткиву деловањем на поспешивање антиоксидативне одбране, редуковањем степена липидне пероксидације и морфолошких промена у ткивима. Важно је истаћи да се доза од 100 mg/kg телесне масе животиња (т.м.) може сматрати најефикаснијом у третману оксидативних оштећења изазваних цисплатином, будући да се показало да је у појединим случајевима доза од 200 mg/kg т.м. показала нижи степен заштите. Узимајући у обзир већину параметара, доза од 50 mg/kg се генерално може сматрати недовољном за достизање значајних побољшања на нивоу ткива. Извесне промене у серумским и ткивним параметрима, које су евидентирани у екстракт-*per se* групама третираним екстрактима у највишој тестираној концентрацији (200 mg/kg т.м.) указују да би терапијске дозе ових екстракта требало да буду ниже од 200 mg/kg т.м.

Базирајући се на представљеним резултатима, екстракти *A. vulgaris* и *S. hortensis* могу бити примењени у различитим гранама индустрије: прехранбеној, фармацеутској и козметичкој. С обзиром на то да је доказано да ови екстракти испољавају снажну антиоксидативну активност, указано је на њихову потенцијалну примену у виду конзерванаса, који би, за разлику од постојећих синтетичких једињења, били безбедни за хуману популацију. У прилог безбедности примене ових биљака говори и чињеница да испитивани екстракти показују потпуну биокомпатибилност са здравим ћелијама коже, не нарушавајући њихов нормалан раст, па се као такви могу сматрати пожељним састојцима козметичких препарата. Како екстракти *A. vulgaris* и *S. hortensis* смањују оксидативна оштећења органа изазвана цисплатином, резултати представљених истраживања дају повода да се размотри и потенцијал ових биљака да се примене у медицинске сврхе и у клиничкој пракси, као допунска терапија уз конвенционалну хемиотерапију или као компонента дијететских суплемената за побољшање општег стања организма.

ABSTRACT

The aim of the presented Ph.D. thesis was to phytochemically and pharmacologically characterize two plants - *Alchemilla vulgaris* (family Rosaceae) and *Satureja hortensis* (family Lamiaceae), which have been applied as therapeutics in traditional medicine, but reports on their biological activity and chemical profile are scarce. Considering the mentioned, the main subjects of this Ph.D. thesis are a chemical analysis of the main compounds presented in these plants as well as their biological potential under both *in vitro* and *in vivo* conditions.

The results obtained from high-performance liquid chromatography showed that methanol extracts of aerial parts and roots of *A. vulgaris* and aerial parts of *S. hortensis* are rich in phenolic compounds, especially in the phenolic acids and flavonoids contents. Ellagic acid has been identified as a main component in the aerial parts extract of *A. vulgaris*, while catechin-gallate was the major compound in the roots extracts from the same plant. Rosmarinic acid, presented in a high amount in the extract of aerial parts of *S. hortensis* (249 mg/g dry weight of extract) was the main active component of this extract. Among these compounds, other classes of phenolics, such as flavonols, flavones, flavanones, and their derivatives were also identified in all extracts. By spectrophotometric determinations, it can be concluded that the investigated extracts are rich in phenolic compounds – approximately one-third of all compounds in extracts were measured as polyphenols. Especially, the extracts possessed a significant number of condensed tannins and phenolic acids, while the content of anthocyanins (both monomeric and total) was negligible.

Several methods have been applied in order to assess the antioxidant activity of *A. vulgaris* and *S. hortensis* extracts. High total antioxidant capacity was observed for all extracts. Besides, all tested extracts were found to possess strong ability to neutralize DPPH[•] и [•]OH radicals, ABTS^{•+} radical cation and to inhibit the lipid peroxidation process at IC₅₀ concentrations similar or even lower than those obtained for well-known antioxidants from natural origin (ellagic acid and catechin) or synthetic antioxidants (butylated hydroxytoluene). Moreover, extracts showed pronounced ferric ion reducing power. However, the extracts did not show the ability to chelate transition metals.

For the antimicrobial activity assay, the microdilution method was employed against nine bacterial and nine fungal species as well as against yeast. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of extracts were in the range of 0,156-5 mg/mL for the extract obtained from aerial parts of *A. vulgaris*, and from 0,156 to 10 mg/mL for the root extract of the same plant and aerial parts extract of *S. hortensis*. Three Gram-negative species, namely *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Azotobacter chroococcum*, were the most resistant to the extracts (MIC = 2,5 - 10 mg/mL). On the other hand, at significantly lower concentrations, all extracts inhibited the growth of some Gram-positive bacteria (*Micrococcus*

lysodeikticus, *Enterococcus faecalis* и *Bacillus mycoides*). In contrast, no antifungal activity of extracts was observed against tested fungal species, because MICs were observed at high concentrations (>2 mg/mL).

The anti-inflammatory activity of extracts was analyzed by enzyme immunoassay, employed for the measurements of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 enzyme activities. The extract of aerial parts of *S. hortensis* has demonstrated the highest activity in suppressing the activity of both cyclooxygenase isoforms (60,94% for COX-1 and 70,66% for COX-2). Regarding COX-1, both extracts from *A. vulgaris* showed the similar percent of enzyme activity inhibition (45%), while the aboveground parts extract was more efficient (63,56%) in comparison to root extract (40,72%) in inhibiting the COX-2 activity. The obtained results showed that *S. hortensis* exhibits inhibition of COX-2 via the Nf- κ B signaling pathway. Contrary to this, the negative value obtained for the COX-2 gene expression when *A. vulgaris* applied suggests that the COX-2 inhibition occurs by the different molecular mechanisms.

The general safety of extracts was investigated on healthy human keratinocytes cell lines and mouse fibroblasts. The obtained results indicate the full biocompatibility of the tested extracts, suggesting that their application could not affect the proliferation and metabolic activity of normal cells.

Taking into consideration that extracts exhibit promising antioxidant activity *in vitro*, the further step in our experiment was to investigate, for the first time, the possible role of the extracts to reduce the cisplatin-induced oxidative damage in the liver, kidney, and testes. The obtained results undoubtedly suggest that treatment with *A. vulgaris* и *S. hortensis* extracts leads to normalization of tissues' parameters in serum, amelioration of redox state of the tissue by the reparation of the antioxidant defense system, as well as by restoration of tissue's morphology. It is worth noting that the dose of 100 mg/kg body weight could be considered as the most efficient in attenuating the cisplatin-induced toxicity. The results obtained for the highest tested dose of extracts (200 mg/kg body weight) indicate that this dose provides lower level of antioxidant defence. This is in accordance with the results obtained in extract *per se* groups – in some cases when extract applied alone at a dose of 200 mg/kg, certain of morphological and functional parameters are altered. In summary, the dose of 50 mg/kg may not be sufficient to ameliorate the toxicological alterations induced by cisplatin.

Based on the presented results, the extracts of *A. vulgaris* and *S. hortensis* may be applied in the food, pharmaceutical or cosmetic industry. Because of the significant antioxidant activity, these extracts can be used as preservatives, which use may be harmless to the human population, unlike the use of synthetic ones. Moreover, the extracts exhibited full biocompatibility with normal skin cells, so they may be preferred ingredients in cosmetics. With regard to the ability of extracts to reduce the cisplatin-induced oxidative damage in tissue, the tested extracts may be applied as adjuvants in conventional chemotherapy or as components of dietary supplements to improve and maintain general health.

Садржај

Резиме

Abstract

Листа скраћеница

Листа слика

Листа схема

Листа табела

1. Уводни део	1
2. Општи део	5
2.1. Основне карактеристике и секундарни метаболити биљака <i>Alchemilla vulgaris</i> L. и <i>Satureja hortensis</i> L.....	6
2.1.1. <i>Alchemilla vulgaris</i> L. (Rosaceae)	6
2.1.2. <i>Satureja hortensis</i> L. (Lamiaceae)	8
2.2. Секундарни метаболити биљака са освртом на фенолна једињења	9
2.3. Фенолни профил и биолошке активности биљке <i>A. vulgaris</i>	17
2.4. Фенолни профил и биолошке активности биљке <i>S. hortensis</i>	22
2.5. Биосинтеза фенолних једињења испитиваних биљака.....	28
2.6. Биолошки потенцијал лековитих биљака и фенолних једињења.....	37
2.6.1. Антимикробна активност	37
2.6.2. Антиоксидативна активност	41
2.7. Оксидативни стрес у ткивима	50
2.7.1. Морфофункционалне карактеристике јетре, бубрега и тестиса	50
2.7.2. Оксидативни стрес у ткивима изазван хемиотерапеутицима	59
2.7.3. Оксидативни стрес и инфламаторни процеси	63
3. Радне хипотезе и циљеви истраживања	67
4. Материјал и методе истраживања	71
4.1. Прикупљање и обрада биљног материјала и припрема екстракта	72
4.2. UHPLC/DAD-(-)HESI-MS/MS анализа	73
4.3. Методе за квантитативно одређивање фенолних једињења	74
4.3.1. Одређивање садржаја фенолних једињења у екстрактима	74
4.3.2. Одређивање садржаја флавоноида у екстрактима	75
4.3.3. Одређивање садржаја хидроксициметних киселина	76

4.3.4. Одређивање садржаја антоцијана у екстрактима	77
4.3.5. Одређивање садржаја проантоцијанидина у екстрактима	78
4.3.6. Одређивање количине хидролизабилних танина	79
4.4. <i>In vitro</i> испитивање антиоксидативног потенцијала екстракта <i>A. vulgaris</i> и <i>S. hortensis</i>	80
4.4.1. Одређивање DPPH* „скевинцер“ капацитета екстракта	80
4.4.2. Одређивање способности неутрализације ABTS ^{•+} радикал катјона	81
4.4.3. Способност неутрализације •ОН радикала	83
4.4.4. Одређивање укупне антиоксидативне способности екстракта	84
4.4.5. Одређивање способности редукције јона метала	84
4.4.6. Одређивање способности хелирања јона метала	86
4.4.7. Инхибиција стварања липидних пероксида	87
4.5. Антимикробна активност биљних екстракта	88
4.5.1. Коришћени микроорганизми	88
4.5.2. Припрема микроорганизма за испитивање антимикробне активности	89
4.5.3. Одређивање антимикробне активности екстракта микродилуционом методом	90
4.6. Одређивање антиинфламаторне активности биљних екстракта <i>A. vulgaris</i> и <i>S. hortensis</i>	91
4.6.1. Инхибиторна активност на нивоу циклооксигеназа	91
4.6.2. Испитивање инхибиције COX-2 механизмом инхибиције експресије NF-κB/COX-2 гена	93
4.7. Биокомпатибилност екстракта <i>A. vulgaris</i> и <i>S. hortensis</i>	95
4.8. <i>In vivo</i> испитивање антиоксидативног потенцијала екстракта	96
4.8.1. Експерименталне животиње	96
4.8.2. Експериментални протокол	97
4.8.3. Припрема серума	98
4.8.4. Одређивање функционалних параметара јетре у серуму	99
4.8.5. Одређивање параметара оштећења бубрега у серуму	105
4.8.6. Одређивање функционалних параметара тестиса у серуму	109
4.9. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткивима	110
4.9.1. Припрема хомогената	110
4.9.2. Одређивање количине укупних протеина	110
4.9.3. Одређивање активности каталазе	111

4.9.4. Одређивање активности супероксид дисмутазе.....	112
4.9.5. Одређивање количине редукованог глутатиона	113
4.9.6. Одређивање степена липидне пероксидације у ткиву на основу количине супстанци које реагују са тиобарбитурном киселином (TBARS)	115
4.10. Хистоморфолошка и патолошка анализа исечака јетре, бубрега и тестиса...	116
4.11. Статистичка обрада података	117
5. Резултати и дискусија	118
5.1. Фенолни профил екстракта <i>A. vulgaris</i> и <i>S. hortensis</i>	119
5.2. Садржај фенолних једињења у екстрактима испитиваних биљака.....	131
5.3. Антиоксидативна активност екстракта испитиваних биљака	133
5.4. Антимикробна активност	140
5.4.1. Антибактеријска активност	140
5.4.2. Антифунгална активност	142
5.5. Антиинфламаторна активност	146
5.6. Биокомпатибилност екстракта <i>A. vulgaris</i> и <i>S. hortensis</i>	149
5.7. Антиоксидативни потенцијал екстракта у <i>in vivo</i> условима	153
5.7.1. Испитивање функционалних параметара ткива у серуму експерименталних животиња.....	154
5.7.2. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткивима	163
5.7.3. Хистопатолошка анализа.....	172
Закључак.....	185
Литература	190
Биографија са библиографијом.....	217
Прилог	227

Списак скраћеница А-III

АВК - метанолни екстракт корена *Alchemilla vulgaris* L.
АВН - метанолни екстракт надземног дела *Alchemilla vulgaris* L.
АДЕ - атрофија и десквamacија покровног епитела каналића
АТП - аденозин трифосфат
БХА - бутил хидроксианизол
БХТ - бутил хидрокситолуен
ДАГ - дегенерација и атрофија герминативног епитела семиниферних каналића
ДЛћ - деплeција Лејдигових ћелија
ЕДТА - етилендиаминтетрасирћетна киселина
ЕКГ - еквиваленти галне киселине
ЕКК - еквиваленти кафеинске киселине
ЕРУ - еквиваленти рутина
ЕЦЗГ - еквиваленти цијанидин-3-глукозида
ИЕ - интерстицијумски едем
ИИ - интерстицијски инфилтрат
ИЛД - дегенерација и интралуминална десквamacија Сертолијевих ћелија
ИХД - интралуминални хијалини депозити
КГА - кромпир-глукозни агар
КН - конфлуентна некроза
ЛИ - лимфоцитни инфилтрат
Лћ - Лејдигове ћелије
МИК - минимална инхибиторна концентрација
МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид
МХП - Müller–Hinton-ова течна подлога
ПБП – проширење субкапсуларног Боумановог простора
ПГ - пропил-галат
ПП - портни простор
СДА - Sabouraud декстрозни агар
Сћ - Сертолијеве ћелије
СХН - метанолни екстракт надземног дела *Satureja hortensis* L.
т.м. - телесна маса животиња
ФН - фокална литичка некроза хепатоцита
ФЧ реагенс - Folin-Ciocalteu реагенс
ХА - хранљиви агар
ХД - хидропсна дегенерација
ХКћ - хиперплазија Купферових ћелија
ЦВ - централна вена
ЦД - цистична дилатација тубула

Списак скраћеница

A-Z

ABTS - 2,2'-азино-*бис*(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина
ad libitum - по вољи
ALP - алкална фосфатаза
ALT - аланин трансаминаза
AST - аспартат трансаминаза
ATCC - стандардни сојеви бактерија и гљива (American Type of Culture Collection)
Balb/c 3T3 - ћелијска линија фибробласта миша
CAT - каталаза
CFU - јединица формирања колонија бактерија или плесни
cGMP - циклични гуанозин монофосфат
CoA - коензим А
DAMP - 3-деокси-D-арабинохептулозонат-7-фосфат
DHF - дихидрофолат
DMEM - Дулбеков медијум са високим садржајем глукозе
DPPH - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DTNB - Елманов реагенс, 5,5'-дитиобис(2-нитробензоева киселина)
ECLIA - електрохемилуминисцентна метода
ELISA - имуноензимски тест
FBS - фетални говеђи серум
FDA - Америчка агенција за храну и лекове
FSB - изолати бактерија и плесни из биолошких узорака
FSH - фоликулостимулирајући хормон
GC - гасна хроматографија
GGT - γ -глутамил трансфераза
GSH - редуковани глутатион
GSSG - оксидовани глутатион
HaCaT - ћелијска линија хуманих кератиноцита
HCA - хијерархијска кластер анализа
HeLa ћелије - ћелијска линија канцера грлића материце
HEPES - хидроксиетил пиперазинетансулфонска киселина
HILIC - хроматографија хидрофилних интеракција
HPLC - течна хроматографија високих перформанси
HPTLC - танкослојна хроматографија високих перформанси
i.p. - интраперитонеално
IC₅₀ - концентрација која доводи до неутрализације 50% слободних радикала
IL-6 - интерлеукин 6
in silico - експеримент спроведен употребом компјутера или компјутерске симулације
in vitro - "у стаклу", експеримент у контролисаним условима изван биолошког окружења
in vivo - "уживо", експеримент вођен у живим организмима
LDH - лактат дехидрогеназе
LH - лутеинизирајући хормон

LOX - липоксигеназа
LPS - липополисахарид
 m/z однос - однос маса/наелектрисање јона
MDA - малондиалдехид
MDH - малат дехидрогеназа
NADH - редуковани никотинамид аденин динуклеотид
Nf- κ B - нуклеарни фактор капа Б
NSAIDs - нестероидни неселективни антиинфламаторни лекови
O.D. - оптичка густина
p.o. - "per os", орално
PAL - фенилаланин амонијум лијаза
PBS - физиолошки раствор пуферисан фосфатом
PCA - анализа главне компоненте
per se - самостално; *овде*: самостална примена екстракта
PGH₂, PGE₂, PGD₂, PGG₂, PGI₂ и PGF_{2 α} - простагландини H₂, E₂, D₂, G₂, I₂ и F_{2 α}
RNS - реактивне врсте азота
ROS - реактивне врсте кисеоника
RT-PCR - квантитативна полимеразна ланчана реакција
SAR анализа - анализа односа структуре и активности једињења
SDS - натријум додецил сулфат
SOD - супероксид дисмутаза
SRM - мод за праћење изабраног фрагмента
TBARS - реактивне супстанце тиобарбитурне киселине
TBHQ - *t*-бутил-хидрохинон
THF - тетрахидрофолат
TNF- α - фактор некрозе тумора α
TXA₂ и TXB₂ - тромбосани A₂ и B₂
UHPLC/DAD-(-)HESI-MS² - ултраефикасна течна хроматографија високих перформанси куплована са UV-Vis и масеним детектором
UV-Vis област - ултраљубичаста-видљива област спектра
PABA - *p*-аминобензоева киселина
COX-1, -2 и -3 - циклооксигеназа-1, -2 и -3
TBA - тиобарбитурна киселина
TCA - трихлорсирћетна киселина

Списак слика

Слика 1. <i>Alchemilla vulgaris</i> L.....	6
Слика 2. <i>Satureja hortensis</i> L.	8
Слика 3. Општа структура флавоноида.....	12
Слика 4. Структуре галата и шећерних компонената	15
Слика 5. Структуре елагитанина идентификованих у биљци <i>A. vulgaris</i>	16
Слика 6. Структура елагинске киселине.....	18
Слика 7. Структура рузмаринске киселине.....	27
Слика 8. Механизми деловања антимикуробних агенаса.	40
Слика 9. Оксидативна фосфорилација у митохондријама и генерисање супероксид радикала.....	41
Слика 10. Реактивне кисеоничне врсте у биолошким системима.	43
Слика 11. Оксидативна оштећења протеина, ДНК и липидна пероксидација као последица присуства реактивних врста кисеоника и азота (eNOS).....	44
Слика 12. Структуре најпознатијих синтетичких антиоксиданата: бутиловани хидрокситолуен (БХТ), бутиловани хидроксианизол (ВНА), t-бутилхидрохинон (ТВНҚ) и пропил галат (PG).....	47
Слика 13. Анатомска и функционална организација јетре са издвојеним приказом класичног лобулуса јетре.....	52
Слика 14. Попречни пресек бубрега, са издвојеним приказом крвних судова и каналића нефрона	53
Слика 15. Ренални корпускул.	55
Слика 16. Грађа тестиса.	57
Слика 17. Структура цисплатине.....	59
Слика 18. Графички приказ цитотоксичног деловања цисплатине.....	61
Слика 19. Механизам нефротоксичности цисплатине.....	62
Слика 20. Структура арахидонске киселине.....	64
Слика 21. Осушени биљни материјал: а) надземни део и корен <i>A. vulgaris</i> , б) надземни део <i>S. hortensis</i>	72
Слика 22. Комплексирање рутина алуминијумом.....	76
Слика 23. Хелатирање гвожђа (II) на примеру кверцетина.....	86
Слика 24. HPLC-DAD хроматограм фенолних једињења идентификованих у метанолном екстракту надземног дела (ABH) и корена (ABK) <i>Alchemilla vulgaris</i>	123
Слика 25. SRM хроматограм са дијагностичким фрагментима за једињења идентификована у метанолном екстракту надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i>	124
Слика 26. HPLC-DAD хроматограм фенолних једињења идентификованих у метанолном екстракту надземног дела <i>Satureja hortensis</i>	127
Слика 27. Редуктивна активност екстракта надземног дела (ABH) и корена вирка (ABK) и надземног дела чубра (CXH), референтних једињења и синтетског антиоксиданта (БХТ).	137
Слика 28. Инхибиторни ефекат екстракта ABH, ABK и CXH, као и референтних једињења.....	146

Слика 29. Биокompatibilност екстраката надземног дела <i>A. vulgaris</i> , корена <i>A. vulgaris</i> и надземног дела <i>S. hortensis</i> са ћелијским линијама хуманих кератиноцита HaCaT (A) и фибробласта миша Balb/3T3, клон A31 (Б).....	150
Слика 30. Утицај цисплатине, елагинске киселине и екстраката надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i> на активност супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова.	164
Слика 31. Утицај цисплатине, елагинске киселине и екстраката надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i> на ниво глутатиона (GSH) и тиобарбитурна киселина-реагујућих једињења (TBARS) у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова.....	167
Слика 32. Утицај цисплатине, силимарина и екстраката надземног дела <i>S. hortensis</i> на активност супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова.	169
Слика 33. Утицај цисплатине, силимарина и екстраката надземног дела <i>S. hortensis</i> на ниво глутатиона (GSH) и тиобарбитурна киселина-реагујућих једињења (TBARS) у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова.	170
Слика 34. Хистопатолошка анализа исечака јетре животиња третираних цисплатином, елагинском киселином и екстрактима надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i>	174
Слика 35. Хистопатолошка анализа исечака ткива бубрега животиња третираних цисплатином, елагинском киселином и екстрактима надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i>	175
Слика 36. Хистопатолошка анализа исечака ткива тестиса животиња третираних цисплатином, елагинском киселином и екстрактима надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i>	176
Слика 37. Хистопатолошка анализа исечака јетре животиња третираних цисплатином, силимарином и екстрактом надземног дела <i>S. hortensis</i>	178
Слика 38. Хистопатолошка анализа исечака бубрега животиња третираних цисплатином, силимарином и екстрактом надземног дела <i>S. hortensis</i>	179
Слика 39. Хистопатолошка анализа исечака тестиса животиња третираних цисплатином, силимарином и екстрактом надземног дела <i>S. hortensis</i>	180

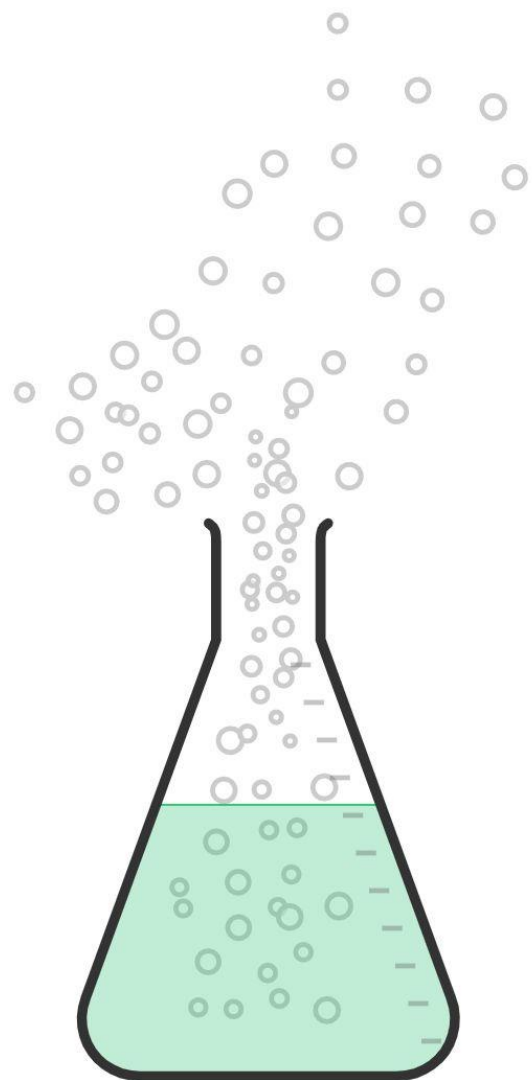
Списак схема

Схема 1. Биосинтеза елагинске киселине.....	29
Схема 2. Претпостављени метаболизам елагинске киселине и структуре њених метаболита.....	31
Схема 3. Биосинтеза ароматичних аминокиселина из шикимске киселине..	33
Схема 4. Биосинтеза фенолних киселина и рузмаринске киселине.	34
Схема 5. Биосинтеза различитих класа флавоноидних једињења.....	36
Схема 6. Резонантне форме фенокси радикала	48
Схема 7. Δ^4 и Δ^5 пут биосинтезе тестостерона.....	59
Схема 8. Реверзибилна промена структуре антоцијана у зависности од промене pH средине.....	77
Схема 9. Реакција формирања метиленског моста између А-прстена танина и формалдехида	79
Схема 10. Редукција љубичасто обојеног DPPH радикала до жутог DPPH у присуству антиоксиданата.....	80
Схема 11. Неутрализација ABTS у присуству антиоксиданата	82
Схема 12. Редукција Fe^{3+} (калијум-хексацијаноферата(III)) до Fe^{2+} (пруско плаво, комплекс гвожђе(III)хексацијаноферат(II)) у присуству антиоксиданата	85
Схема 13. Генерисање липидних хидропероксида линолне киселине и реакција настајања црвеног комплекса Fe^{3+} са тиоцијанатом	87
Схема 14. Редукција ресазурина до резоруфина у присуству микроорганизама.....	90
Схема 15. Редукција МТТ до љубичасто обојеног формазана у присуству митохондријалне дехидрогеназе.....	95
Схема 16. Биуретска реакција.....	99
Схема 17. Реакција преноса $-NH_2$ групе катализована аспартат трансминазом (AST) и куплована реакција редукције оксалоацетата до малата деловањем малат дехидрогеназе (LDH)	100
Схема 18. Реакција преноса $-NH_2$ групе катализована аланин трансминазом (ALT) и куплована реакција редукције пирувата у лактат деловањем лактат дехидрогеназе (LDH)	101
Схема 19. Реакција трансфера γ -глутамил групе на дипепид посредована γ -глутамил трансферазом (GGT)....	102
Схема 20. Реакција хидролизе естарске везе каталитичком активношћу алкалне фосфатазе која води ослобађању фосфата и грађењу жуто обојеног производа.	103
Схема 21. Настајање азобилирубина реакцијом између конјугованог билирубина и диазотоване сулфанилне киселине.	105
Схема 22. Купловане реакције одређивања мокраћне киселине у серуму	106
Схема 23. Купловане реакције одређивања урее у серуму.	107
Схема 24. Формирање црвено обојеног Јановски комплекса у базној средини реакцијом између креатинина и пикринске киселине.	108
Схема 25. Оксидација редукованог облика глутатиона (GSH) до оксидоване форме (GSSG).....	114
Схема 26. Формирање ружичасто обојеног комплекса MDA-TBA ₂ у реакцији између тиобарбитурне киселине (TBA) и малонилдиалдехида (MDA).....	115

Списак табела

Табела 1. Систематика и графички приказ биљке <i>Alchemilla vulgaris</i> L.....	7
Табела 2. Систематика и графички приказ <i>Satureja hortensis</i> L.	9
Табела 3.Структуре фенолних киселина идентификованих у <i>A. vulgaris</i> и <i>S. hortensis</i>	11
Табела 4. Структуре најзначајнијих флавоноида идентификованих у <i>A. vulgaris</i> и <i>S. hortensis</i>	13
Табела 5. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода <i>Alchemilla</i> L.	18
Табела 6. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода <i>Satureja</i> L.....	24
Табела 7. Списак микроорганизама коришћених у испитивању антимикуробне активности биљних екстраката....	89
Табела 8. UHPLC-qqqMS ² идентификација и квантификација фенолних једињења присутних у екстрактима надземног дела и корена <i>Alchemilla vulgaris</i> у моду праћења одабране реакције (SRM), коришћењем два дијагностичка MS ² фрагмента.	122
Табела 9. UHPLC-qqqMS ² идентификација и квантификација фенолних једињења присутних у екстракту <i>Satureja hortensis</i> коришћењем два дијагностичка MS ² фрагмента и података добијених DAD детектором.	126
Табела 10. Спектрофотометријско одређивање садржаја различитих класа фенолних једињења.....	131
Табела 11. Антиоксидативна активност метанолних екстраката надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i> и надземног дела <i>S. hortensis</i>	136
Табела 12. Антибактеријска активност екстраката надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i> и надземног дела <i>S. hortensis</i> , референтних фенолних једињења - елагинске киселине и катехина, антибиотика хлорамфеникола и еритромицина.....	142
Табела 13. Антифунгална активност екстраката надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i> и надземног дела <i>S. hortensis</i> , референтних фенолних једињења - елагинске киселине и катехина, антимикутика кетоконазола и нистатина.....	143
Табела 14. Утицај цисплатине и ко-третмана различитих концентрација метанолних екстраката надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i> на биохемијске параметре јетре, бубрега и тестиса у серуму експерименталних животиња.	157
Табела 15. Утицај цисплатине и ко-третмана различитих концентрација метанолних екстраката надземног дела <i>S. hortensis</i> на биохемијске параметре јетре, бубрега и тестиса у серуму експерименталних животиња.	159
Табела 16. Збирне хистолошке промене у ткивним исечцима јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња приликом излагања цисплатини и третману екстрактима надземног дела и корена <i>A. vulgaris</i>	173
Табела 17. Збирне хистолошке промене у ткивним исечцима јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња приликом излагања цисплатини и третману екстрактима надземног дела и корена <i>S. hortensis</i>	177

1. Уводни део



Савремена истраживања из области хемије, фармације и медицине препознала су биљке као потенцијалне изворе хемијских једињења која могу бити примењена за развој нових лекова и дијететских суплемената за превенцију и третман различитих обољења. Тренд испитивања хемијског састава биљака и примена ових једињења у формулацији нових лекова, додатака исхрани и функционалној храни свакако је инспирисан традиционалном употребом биљака у лечењу и превенцији болести људи. На основу археолошких доказа који датирају још из праисторијског доба, стиче се утисак да су ране цивилизације користиле биљке првенствено као извор хранљивих материја¹, да би се тек потом развила знања о њиховим терапеутским ефектима, углавном путем емпиријских закључака и опсервацијама промена које настају након примене одређене биљке.

За разлику од оваквог искључиво искуственог приступа, науку средњовековног периода обележили су први експерименти. У научној терминологији се тада први пут уводи појам лековите материје и активних принципа из природних извора, те су за даљи развој науке веома значајна истраживања оријентисана ка изоловању лековитих компонената применом различитих приступа, чиме су постављене основе фармацеутске хемије. Током XIX века први пут су изоловане органске киселине из природних извора (јабучна, винска киселина), као и велики број алкалоида (морфин, кофеин, теобромин), утемељујући тиме пут развоја хемије природних производа.² Кинин, изолован из коре *Cinchona officinalis* (кининовац) у деветнаестом веку, и вековима употребљаван у регији око Амазона за лечење маларије и повишене температуре, данас представља основу за синтезу антималяријских лекова, заједно са сесквитерпенским ендопероксидом артемисинином, изолованим из пелина (*Artemisia annua*). Комерцијални лек Taxol®, базиран на паклитакселу изолованом из коре тисе (*Taxus brevifolia*), један је од највише испитиваних хемиотерапутика и званично одобрен за лечење тумора јајника и дојке, а његови структурни аналози су већином у I и II фази клиничких студија.³ Активни принципи млечног чкаља (*Silybum marianum*), силимарин флавонолигнани, данас су широко у употреби као хепатопротективи у разним патолошким стањима јетре⁴, а један од најзаступљенијих лекова у третману дијабетеса типа 2, метформин, представља дериват алкалоида галегина, који је изолован из ждраљевине (*Galega officinalis*).⁵

Према подацима Светске здравствене организације, за чак четири петине до сада испитаних једињења изолованих из биљака потврђено је биолошко деловање сагласно употреби у етнофармацији.⁶ Поред тога, око половина конвенционалних анти-канцерогених лекова садржи једињења директно изолована из биљака или њихове синтетске деривате.⁷ Медицинска пракса данас препознаје препарате природног порекла као препоручену терапију у око 25% случајева⁸, а чак 547 препарата на бази природних производа и њихових деривата одобрено је до краја 2013. године за лечење инфективних, кардиоваскуларних, имунолошких и других обољења од стране Америчке асоцијације за храну и лекове (FDA). Од укупног броја ових препарата, највећи део (45%) је биљног порекла, док остатак представљају природни производи изоловани из бактерија, гљива и морских организама.⁹ У прилог томе говори и податак једне британске студије у којој је показано да лекови на бази биљака представљају најчешћи избор алтернативних видова лечења међу пацијентима са различитим медицинским дијагнозама.¹⁰ Када је реч о нашем поднебљу, уочава се да су фитопрепарати у великој мери заступљени у лечењу обољења дигестивног система, као што су диспепсија и констипација.¹¹ Разлози за растућу атрактивност формулација на бази биљака у циљу лечења различитих обољења слабог до умереног интензитета леже у чињеници да већина конзумента сматра да је примена оваквих медикамената безбеднија у односу на синтетичке препарате, као и да промовише здравији стил живота.¹²⁻¹⁴ Ипак, као критичне тачке у примени фитопрепарата наводе се могућност контаминације биљног материјала, остаци пестицида и других токсичних материја, неадекватна прерада и складиштење, као и одсуство података о хемијском профилу и активним материјама, па је предуслов за њихову употребу строжа контрола готових фитопрепарата и функционалних производа са циљем повећања безбедности препарата доступних широј популацији.^{15,16} Један од већих изазова са којима се савремена фитофармација сусреће је и комплексност хемијског састава биљака. Међусобне интеракције између њихових компонената, које могу бити синергистичке, антагонистичке или агонистичке, доприносе специфичним биолошким активностима биљних екстраката, које често премашују терапеутски потенцијал појединачних активних материја.¹⁷ Стога није увек могуће са сигурношћу детектовати одређено једињење или групу једињења која испољава неку биолошку активност, јер она често може бити резултат укрштеног дејства са једињењима која нису идентификована.¹⁸ Поред тога, познавање хемијског састава неопходно је и са аспекта етнофармакологије, будући да географско порекло биљке, а самим тим и варијабилности у хемијском саставу, утичу на њену примену у традиционалној медицини.¹⁹

Поред биљних дрога за које су потврђени медицински бенефити и чија је употреба прописана у оквиру фармакопеја, у превентивне и терапеутске сврхе се користе, самостално или у комбинацији са неким лековима, и лековите биљке чији ефекти на здравље људи нису научно верификовани, али се базирају на знањима доступним у традиционалној медицини.²⁰ Иако биљни препарати генерално уживају велико поверење и распрострањено је уверење да је њихова употреба безбедна због њиховог природног порекла²¹, постоје извесни наводи да употреба фитопрепарата може изазвати непредвиђене нежељене ефекте^{22,23}, па су клиничке студије и фармаковигиланца од виталног значаја за проналажење нових лекова и њихову дистрибуцију на тржишту.¹⁸

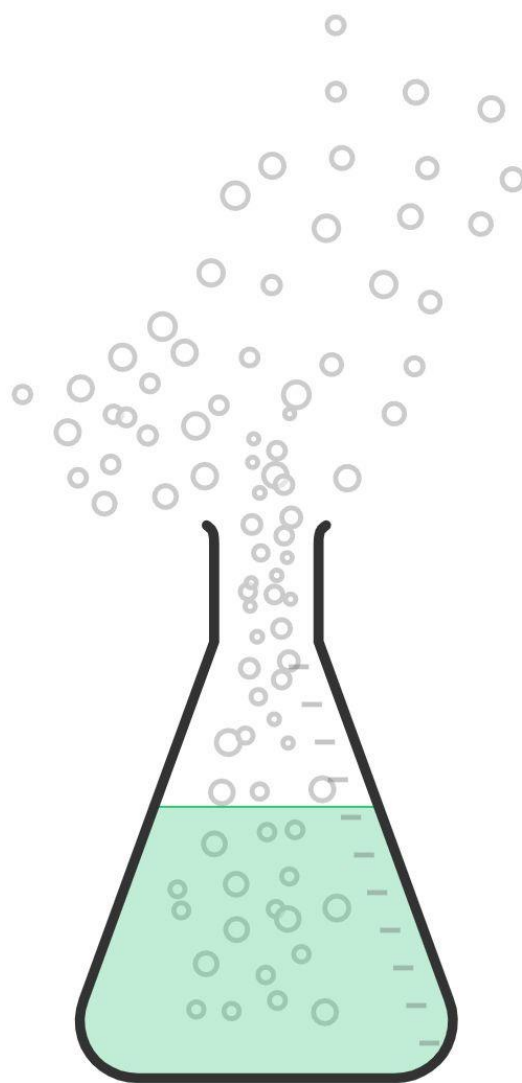
Као што је већ поменуто, један од главних изазова са којима се савремена фармакогнозија сусреће је свакако разнородност и комплексност хемијских једињења присутних у биљкама, па је за валоризацију њиховог терапеутског потенцијала од суштинске важности примењивање савремених лабораторијских анализа у циљу идентификације кључних активних принципа биљке, као и стандардизација добијених биљних препарата. У те сврхе се примењују различите спектроскопске и хроматографске методе, најчешће гасна хроматографија (GC), хроматографија хидрофилних интеракција (HILIC), хроматографија високих перформанси (HPLC, HPTLC, UHPLC), капиларна електрофореза, као и комбинације ових метода са хеометријским анализама, попут хијерархијске кластер анализе (HCA) и анализе главних компонената (PCA).^{24,25} Хемијско профилисање биљних екстраката је тек један од првих корака у процени медицинског потенцијала биљака. Наставак истраживања углавном се спроводи применом широког дијапазона *in vitro* тестова биолошке активности екстраката, које обухватају антиоксидативно, антимикубно, антиинфламаторно, антиканцерогено и друга деловања, да би потом уследила испитивања токсичности и биолошке активности у *in vivo* условима на одабраним модел организмима. Након тога услеђују претклиничка испитивања – фармакодинамичка, фармакокинетичка и токсиколошка тестирања, као и испитивања апсорпције, дистрибуције, метаболизма и екскреције самог тестираног агенса. Само мали број биљака са изузетним потенцијалом примене у терапијске сврхе бива подвргнут дугогодишњим клиничким студијама, као условом коначног тржишног пласмана биљног препарата или лека који чине хемијска једињења изолована из биљке.

Савремено доба доприноси константном развоју биоинформатике, те сходно томе, новији приступи у фитотерапији подразумевају и примену *in silico* метода (путем софтверских симулација), чији је немерљив значај у компјутерској предикцији интеракција које се остварују било међусобно између једињења или између једињења и

мета његовог деловања.²⁶ У немалом броју случајева врши се изоловање и пречишћавање кључне компоненте, али и развијање њених синтетичких деривата са израженијим биолошким својствима у односу на компоненту биљног порекла.²⁷

Узимајући у обзир комплексност и опсежност фитохемијских истраживања и неопходност мултидисциплинарног приступа у свим сегментима анализе, и даље је велики број широко распрострањених, етнофармаколошки значајних биљака хемијски неистражен, па изостају и релевантни литературни подаци којима би се верификовала њихова традиционална примена, активне дозе и биолошки ефекти. Примера ради, биљка *Satureja hortensis*, у народу позната као чубар, деценијама је у употреби као зачинска биљка, компонента чајних мешавина и лековито средство у третманима обољења гастроинтестиналног система, са посебним акцентом на олакшавање тегоба услед отежаног варења. Поред тога, биљна врста *Alchemilla vulgaris* (вирак) је од давнина налазила примену у народној медицини за смањење различитих тегоба везаних за репродуктивне органе и инфламаторне процесе. Ипак, прегледом литературе о овим биљакама установљен је недостатак поузданих информација са хемијског и фармаколошког аспекта, чиме је указана потреба да се продубе сазнања о фитохемијском профилу и биопотенцијалу ових биљних врста, па је то био мотив за спровођење детаљних *in vitro* и *in vivo* истраживања екстраката поменутих биљака у оквиру ове дисертације.

2. Општи део



2.1. Основне карактеристике и секундарни метаболити биљака *Alchemilla vulgaris* L. и *Satureja hortensis* L.

2.1.1. *Alchemilla vulgaris* L. (Rosaceae)

Фамилија Rosaceae обухвата око 3000 биљних врста које су географски веома распрострањене, углавном на северној хемисфери. Биљке ове фамилије расту у виду дрвећа, жбунова, шибља или зељастих вишегодишњих биљака, док су једногодишње биљке веома мало заступљене. Ова фамилија је заступљена у флори Балканског полуострва са 188 описаних биљних врста, а најзаступљенији су родови *Alchemilla*, *Prunus*, *Rubus*, *Sorbus* и *Crataegus*.²⁸

Род *Alchemilla* обухвата преко 200 вишегодишњих зељастих биљних врста и један је од најбројнијих у оквиру фамилије Rosaceae. Врсте рода *Alchemilla* се одликују одрвенелим ризомом и усправном стабљиком која се развија из средишта приземних листова. Листови су прстасти или благо назубљени, док су цветови жути, двополни и веома мали. Најраспрострањенија биљна врста рода *Alchemilla* је *Alchemilla vulgaris* L. (Слика 1), вишегодишња зељаста биљка која је у народу позната као вирак, вркута, бисерак, госпин плашт и ситна росаница.²⁹ Таксономски положај биљне врсте *Alchemilla vulgaris* приказан је у Табели 1.



Слика 1. *Alchemilla vulgaris* L. (извор: Татјана Јурић, 2018.).

Вирак се карактерише усправном стабљиком, висине до пола метра, а најчешће око десетак центиметара. Листови су мањи, режњевити и изрецкани дуж целог обода. Цваст је широка метлица, а цветови су ситни, без мириса и зелено-жуте боје, а јављају се

у периоду од јуна до септембра. Вирак је широко распрострањен и расте на влажним подручјима - ливадама, пашњацима, поред потока, пре свега у брдско-планинским пределима. У Србији расте на Копаонику, Гочу, Проклетијама и Старој планини.^{29,30} Вирак је назив добио од арапске речи *alkemelych*, алхемичар, истичући тиме да су алхемичари у средњем веку веровали да се из капљица росе сакупљених са обода биљака могу добити златне нити.²⁹

Први историјски записи о *A. vulgaris* датирају још из раног XVI века и према постојећим изворима, сматра се да је управо тада биљка описана под садашњим именом од стране немачког ботаничара Трагуса (Hieronymus Bock; Tragus). У то време се вирак сматрао биљком која, примењена у виду облоге, лечи све ране.³¹

Табела 1. Систематика и графички приказ биљке *Alchemilla vulgaris* L.

<i>Regnum</i> (царство)	<i>Plantae</i>	
<i>Classis</i> (класа)	<i>Magnoliopsida</i>	
<i>Ordo</i> (ред)	<i>Rosales</i>	
<i>Familia</i> (фамилија)	<i>Rosaceae</i>	
<i>Genus</i> (род)	<i>Alchemilla</i>	
<i>Species</i> (врста)	<i>Alchemilla vulgaris</i> L.	

A. vulgaris L.^a

^a Извор фотографије: http://www.biolib.de/sturm/flora08/high/IMG_9663.html

Други средњовековни наводи такође истичу лековитост вирка, и то његовог корена у облику сувог праха за лечење бруха код деце, док се цела биљка препоручивала за смањивање температуре, спречавање губитка крви и ублажавање болова. Иако је средњовековни биолог Џон Хил (John Hill) сматрао да је корен вирка, било свеж или осушен, његов најлековити део, Британска фармакопеја наводи употребу искључиво сувих надземних делова биљке за лечење акутне дијареје код беба и одраслих, као и менорагије код женске популације и то по 2 - 4 грама три пута у току дана.³¹ У прилог томе, у оквиру монографије о биљним дрогама, Комисија Е (саветодавни научни орган немачког Савезног института за лекове и медицинска средства (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte)), је одобрила оралну употребу *A. vulgaris* у третману умерене дијареје и гастроинтестиналних обољења.³² Вирак се у народу користи примарно за лечење поремећаја женског репродуктивног система, за регулисање менструалног циклуса и смањење пропратних нелагодности менопаузе. Према наводима Марије Требен³³, ова биљка делује као благи спазмолитик и адстригент, те се користи за

зарастање рана, као диуретик и за јачање срчаног мишића. Користи се у виду чаја, тако што се кашичица осушене дроге прелије шољом вреле воде и остави да кратко одстоји. Поред тога, листови вирка се могу користити и за припремање салата, узимајући у обзир да садрже велику количину аскорбинске киселине (130 mg на 100 g).³⁰

2.1.2. *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae)

Фамилија Lamiaceae (уснатице) једна је од најбројнијих ангиоспермних фамилија (цветница) на свету (шеста по бројности) са преко 7000 биљних врста организованих у оквиру 236 родова широко распрострањених на свим континентима, изузимајући северна поларна подручја.³⁴ Род *Satureja* броји око 200 биљних врста.³⁵ У флори Србије је род *Satureja* представљен са свега три врсте, *Satureja montana*, *Satureja hortensis* и *Satureja subspicata*, које се морфолошки карактеришу листовима са утиснутим жлездама и пурпурно-ружичастим ситним цветовима, чија је чашица у облику звона, а круница двоусната.²⁹

Биљка *Satureja hortensis* L. (чубар, чубрика; Слика 2) је једногодишња зељаста биљка која расте у облику жбуна и висока је до 40 центиметара. Листови су наспрамни и садрже доста жлезда локализованих дуж обода листа. Цветови су ситни и ружичасти, а јављају се током летњих месеци (јун-август). Таксономски положај биљне врсте *Satureja hortensis* представљен је у Табели 2.



Слика 2. *Satureja hortensis* L. (извор: Владимир Михаиловић, 2016.).

Чубар је претежно гајена биљка, чија култивација је релативно једноставна и незахтевна, будући да јој погодује топло и растресито земљиште. У природи се среће на обронцима планина и у каменитим подручјима. У етномедицини се користи надземни део биљке у цвату. Захваљујући великој количини етарског уља, осушена дрога има

пријатан зачински мирис који подсећа на оригано, те чубар налази примену у кулинарству као замена за бибер или у облику мешавине зачина за припремање теже сварљивих намирница, попут махунарки.³⁶

Табела 2. Систематика и графички приказ *Satureja hortensis* L.

<i>Regnum</i> (царство)	<i>Plantae</i>	
<i>Classis</i> (класа)	<i>Rosopsida</i>	
<i>Ordo</i> (ред)	<i>Lamiales</i>	
<i>Familia</i> (фамилија)	<i>Lamiaceae</i>	
<i>Genus</i> (род)	<i>Satureja</i> L.	
<i>Species</i> (врста)	<i>Satureja hortensis</i> L.	

S. hortensis L.⁶

⁶ Извор фотографије: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Satureja_hortensis_Sturm51.jpg

Још су стари Римљани гајили чубар и користили га као зачин због његове ароматичности, одакле потиче и назив биљке (лат. *saturare* - заситити или лат. *satura* - саксија).³⁷ У форми чаја најчешће се употребљава за смањивање осећаја жеђи, док се за лечење поремећаја рада желуца и цревних тегоба, поред чаја, примењује и алкохолна тинктура. У литератури се наводи и употреба чубра у лечењу шуге³⁸ и као средство за купање, смиривање болова на површини тела и против убода пчела.³⁹ Осушена дрога садржи и велику количину танина, чиме се објашњава и његова примена као адстригента у циљу ублажавања кожных обољења.³⁰ Иако се у народној медицини чубру приписују и афродизијачка својства, ови наводи до сада нису научно верификовани.

2.2. Секундарни метаболити биљака са освртом на фенолна једињења

Биолошки активна једињења која су одговорна за лековито деловање биљака концентрисана су у скоро свим деловима биљке. У току фотосинтетског процеса и истоветним механизмом у свим биљкама настају примарни биомолекули, једињења неопходна за структурне и функционалне карактеристике биљака - угљени хидрати, липиди, протеини и нуклеинске киселине. Катаболичким реакцијама примарних метаболита, специфичним за сваку биљку, као и одговором на биотички и абиотички стрес, настају секундарни метаболити, чија се примарна улога остварује кроз специфичне функције у биљкама – међућелијску комуникацију, физиолошке активности унутар биљке, алелопатске ефекте, одбрану од патогена, фитоалексинску улогу и

репродукцију.⁴⁰ Поред значајне улоге за раст и развој биљака, секундарни метаболити су од великог значаја и за човека, будући да представљају неисцрпан ресурс фармаколошки активних компонената, које могу имати потенцијалну примену у медицини и фармацији, те се новија истраживања усмеравају на изоловање и идентификацију, као и биохемијску карактеризацију ових једињења. Најопштија класификација секундарних метаболита обухвата три групе: фенолна једињења, терпене и једињења са азотом.⁴¹

Биљна фенолна једињења су широко распрострањена и структурно хетерогена група секундарних метаболита које продукују биљке и која се генеришу у току два биосинтетска пута у биљкама – шикиматног и поликетидног пута, дајући физиолошки активне продукте.^{42,43} Хемијски посматрано, у ову класу сврстана су једињења која поседују најмање један ароматични прстен за који је везана једна или више хидроксилних група. У биљкама су углавном присутни у форми гликозида, конјуговани са шећерним остацима, иако се, мада ређе, могу срести и у слободној форми.⁴⁴ Лековито биље, зачини, воће, поврће, језграсто воће (лешник, бадем) и житарице представљају основне ресурсе природних фенола.

Дистрибуција и акумулација фенолних једињења унутар биљке нису подједнако заступљене у свим ткивима и детерминисане су растворљивошћу фенолних једињења, па су тако у води растворни феноли лоцирани у ћелијским вакуолама и другим органелама, док су лигнани концентрисани највећим делом у субепидермалном и епидермалном слоју, где се везују за макромолекуле (протеине, пектин и целулозу) и постају основни структурни елементи ћелијског зида биљака.⁴⁵ Поред тога, заступљеност фенолних једињења у одређеним деловима биљке условљена је и стадијумом раста и развоја биљке, па је тако њихова концентрација у зромом плоду мања него на почетку вегетативног периода. Изузетак представљају црвени плодови, код којих се антоцијани, фенолна једињења одговорна за боју плода, акумулирају на крају фазе сазревања плода.⁴⁶

Полифеноли су у природним изворима присутни углавном у конјугованој форми са моносахаридима (глукозом, рамнозом, галактозом), чиме се повећава њихова хидрофилност, а самим тим и биодоступност. Нови приступи у истраживању форме и количине расположивих полифенола, као што су формулације агликонских структура флавоноида и наночестица или микроенкапсулирање, омогућавају олакшану апсорпцију фенола од стране ћелије, као и њихову бољу искористивост.⁴⁷ Како фенолна једињења нису хомогена у погледу структуре, њихова подела се често врши у односу на број угљеникових атома везаних за основни скелет фенола.⁴⁸ Конкретније, фенолна једињења се деле на просте феноле (C_6), фенолне киселине (C_6-C_3 и C_6-C_1), флавоноиде и њихове

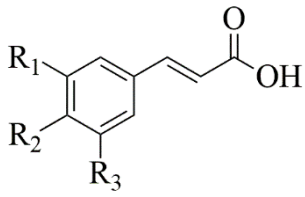
деривате ($C_6-C_3-C_6$), кумарине и хромоне (C_6-C_3), нафтохиноне (C_6-C_4), ксантоне ($C_6-C_3-C_6$), стилбене ($C_6-C_3-C_6$), лигнине и њихове полимере ($(C_6-C_3)_n$) и танине.

Фенолне киселине

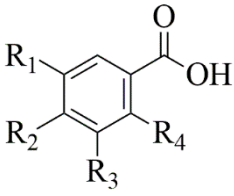
Фенолне киселине обухватају две подгрупе – деривате хидроксициметне (C_6-C_3) и хидроксибензоеве киселине (C_6-C_1). Хидроксилне групе фенолних киселина су углавном конјуговане са шећерима или у форми естара органских киселина (хинске, шикимске и винске киселине), док се у житарицама и у храни подвргнутој различитим технолошким процесима фенолне киселине могу пронаћи и у слободној форми.^{49,50} Деривати циметне киселине (*p*-кумарна, кафеинска, ферулна и синапинска киселина) су заступљенији у биљкама у поређењу са дериватима бензоеве киселине (протокатехинска, гална и *p*-хидроксибензоева киселина) и то у свим деловима биљке. Кафеинска киселина је једна од најзаступљенијих фенолних киселина и у већини воћа представља 75-100% укупног садржаја циметних киселина, док је ферулна киселина доминантна у житарицама.⁵⁰ У какаоу и кафи, циметне киселине су јављају и у форми амида.⁵¹ Главни представник хидроксибензоевих киселина - гална киселина, представља основну структурну јединицу галотанина, док са хексахидроксицифенилним структурама гради елагитанине. Поред тога, ова група фенолних киселина учествује у формирању лигнина у ћелијском зиду биљака.

Претходним истраживањима је утврђено да су биљке *A. vulgaris* и *S. hortensis* богате фенолним киселинама, пре свега њиховим дериватима, елагинском и рузмаринском киселином, о чијим ће структурним карактеристикама и биолошким активностима бити више речи у наредном поглављу. Преглед осталих најзаступљенијих фенолних киселина идентификованих у биљкама *A. vulgaris* и *S. hortensis* представљен је у Табели 3.

Табела 3. Структуре фенолних киселина идентификованих у *A. vulgaris* и *S. hortensis*

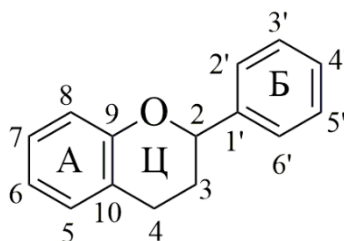
Фенолне киселине				
	Циметне киселине	R ₁	R ₂	R ₃
	<i>p</i> -кумарна киселина	-H	-OH	-H
	Синапинска киселина	-OCH ₃	-OH	- OCH ₃
	Кафеинска киселина	-OH	-OH	-H
	Ферулна киселина	-OCH ₃	-H	-H

Табела 3. Структуре фенолних киселина идентификованих у *A. vulgaris* и *S. hortensis* (наставак)

Фенолне киселине					
	Бензоеве киселине	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	Гална киселина	-OH	-OH	-OH	-H
	Гентизинска киселина	-OH	-H	-H	-OH
	Протокатехинска киселина	-H	-OH	-OH	-H
	Ванилинска киселина	-H	-OH	-OCH ₃	-H
	Салицилна киселина	-H	-H	-H	-OH
	Сирингична киселина	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-H
	<i>p</i> -хидроксibenзоева киселина	-H	-OH	-H	-H

Флавоноиди

Флавоноиди су највећа група фенолних једињења у којима је бензенев прстен везан за бензо-γ-пиранску структуру (флаван), са општом структуром C₆-C₃-C₆ (Слика 3). Два C₆ прстена означена су као А и Б, док C₃ група (прстен Ц), преко које су повезана два бензенова прстена, одређује класу флавоноида будући да се већина структурних разлика, које укључују присуство двоструких веза и оксидацију, одиграва управо на прстену Ц.



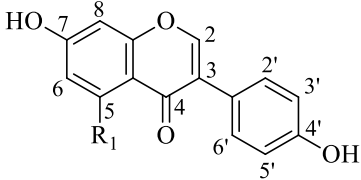
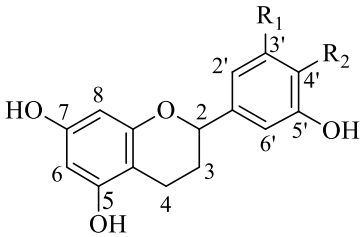
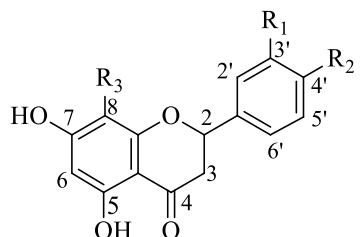
Слика 3. Општа структура флавоноида.

Флавоноиди у којима се веза између Б и Ц прстена остварује преко C3-позиције на Ц прстену означени су као изофлавоноиди, а преко C4-неофлавоноиди.⁵² Када је Б прстен везан за угљеник у позицији 2 Ц прстена, настала једињења се могу поделити у неколико група, у зависности од структурних особина Ц прстена. Једињења са двоструком везом између C2 и C3 и са кето групом у позицији C4 означена су као флавоноиди, чији су најраспрострањенији представници апигенин и лутеолин. Структура флавонола (кемферол, кверцетин, мирицетин) је врло слична флавоноидима, са изузетком присуства хидроксилне групе у положају C3 Ц прстена, која је структурна карактеристика флавонола. Са друге стране, уколико је веза између C2 и C3 у Ц прстену флавонола

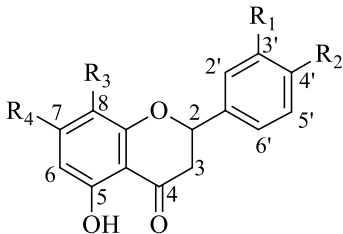
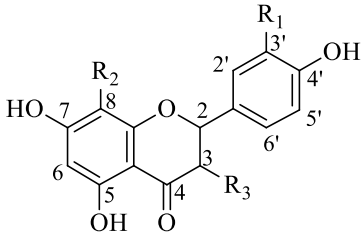
засићена, та једињења су означена као флаванони или дихидрофлавонови (хесперитин, нарингенин). Деривати флаванона са хидроксилном групом у позицији 3 су дефинисани као флаваноли или катехини, према најзаступљенијем представнику - катехину. Поред ових класа, у групу флавоноида убрајају се још и антоцијани и халкони.^{50,53} Поједине биљке синтетишу још две класе флавоноида - 3-деоксиантоцијане и флобафене.⁵⁴

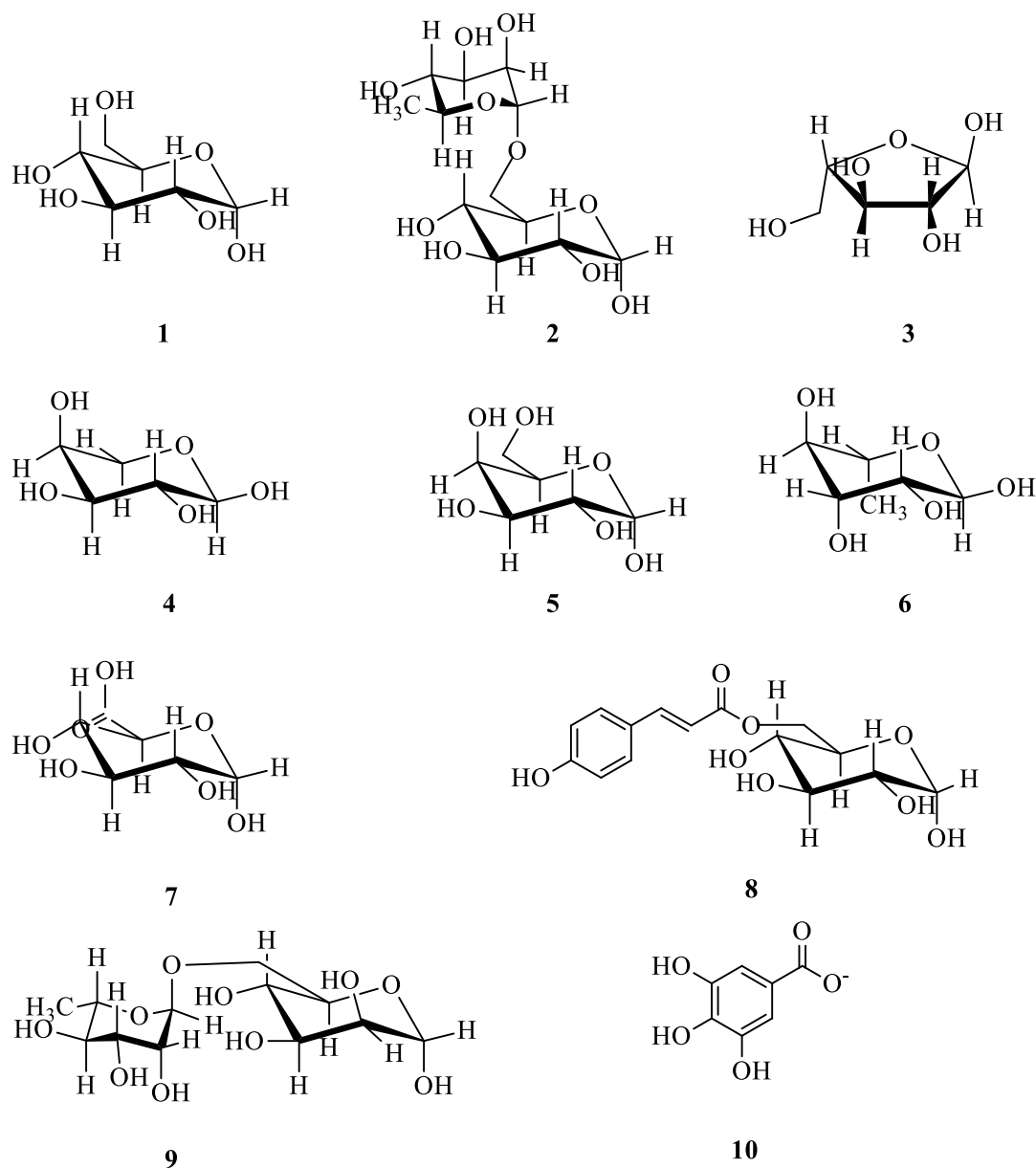
Флавоноиди подлежу реакцијама *O*-гликозилације, а ацетална веза се најчешће формира између шећерне компоненте (глукоза, рамноза, галактоза, ређе дисахариди) и хидроксилне групе у позицији 7 флавонола и флаванола, као и -ОН група антоцијана у положају 3 и 5. Доста ређе, али ипак могуће, нарочито у житарицама, гликозилација може да се оствари и директним повезивањем угљенохидратне компоненте са основним скелетом флавоноида (C6 и C8 прстена А) преко C-C везе награђујући C-гликозидну форму.^{55,56} У Табели 4 дат је приказ најзаступљенијих једињења из класе флавоноида идентификованих у биљним врстама *A. vulgaris* и *S. hortensis*, док су структуре галата и шећерних компонената које улазе у састав поменутих једињења представљене на Слици 4.

Табела 4. Структуре најзначајнијих флавоноида идентификованих у *A. vulgaris* и *S. hortensis*

Класа фенолних једињења	Назив једињења	Супституенти		
Изофлавонови		R₁		
	Генистеин	-ОН		
	Даидзеин	-H		
Флаваноли и њихови деривати		R₁	R₂	
	Катехин	-ОН	-ОН	
	Епикатехин	-H	-ОН	
	Епигалокатехин-галат	-ОН	-галат (10)	
Флаванони и њихови деривати		R₁	R₂	R₃
	Ериодиктол	-ОН	-ОН	-ОН
	Нарингенин	-H	-ОН	-ОН
	Нарингин	-H	-ОН	-неохесперидоза (9)
	Хесперетин	-ОН	-OCH ₃	-ОН
	Хесперидин	-ОН	-OCH ₃	-рутиноза (2)

Табела 4. Структуре најзначајнијих флавоноида идентификованих у *A. vulgaris* и *S. hortensis* (наставак)

Класа фенолних једињења	Назив једињења	Положај супституената			
	Апигенин	-H	-OH	-H	-H
	Витексин	-H	-OH	-глюкоза (1)	-H
	Апигетрин	-H	-OH	-H	-глюкоза (1)
	Лутеолин	-OH	-OH	-H	-H
	Ориентин	-OH	-OH	-глюкоза (1)	-H
	Цинарозид	-OH	-OH	-H	-глюкоза (1)
	Лоницерин	-OH	-OH	-H	-рутиноза (2)
	Диосметин	-OH	-OCH ₃	-H	-H
	Кверцетин	-OH	-H	-OH	
	Рутин	-OH	-H	-рутиноза (2)	
	Изокверцетин	-OH	-H	-глюкоза (1)	
	Авикуларин	-OH	-H	-арабинофураноза (3)	
	Гујаверин	-OH	-H	-арабинопираноза (4)	
	Хиперозид	-OH	-H	-галактоза (5)	
	Кверцитрин	-OH	-H	-рамноза (6)	
	Миквелијанин	-OH	-H	-глукуронид (7)	
	Кемферол	-H	-H	-OH	
	Тилирозид	-H	-H	-6"- <i>p</i> -кумароил-глюкопираноза (8)	
	Астрагалин	-H	-H	-глюкоза (1)	
	Госипетин	-OH	-OH	-OH	
	Родиолгин	-OH	-OH	-рамноза (6)	



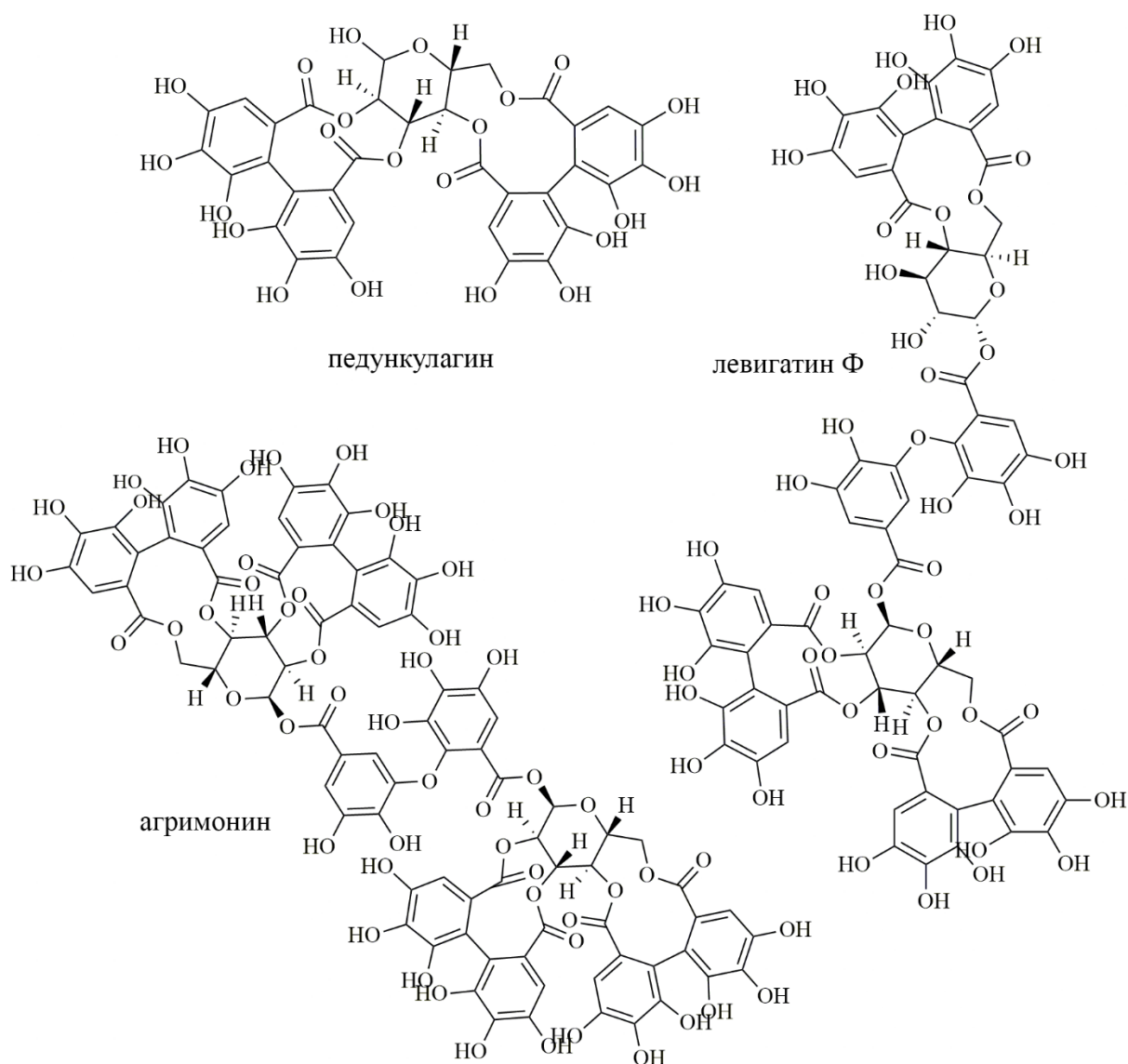
Слика 4. Структуре галата и шећерних компонената представљених у оквиру Табеле 4.

Танини

Танини су хетерогена група полифенолних једињења велике молекулске масе присутна искључиво у вишим биљкама и одговорни су за горак и опор укус воћа и поврћа. Са повећањем броја хидроксилних група, смањује се интензитет горког укуса. Како су танини веома реактивна једињења и могу да граде интра- и интермолекулске водоничне везе, способни су да таложу макромолекуле, попут протеина.⁵⁷ Базирајући се на структурним карактеристикама, танине је могуће класификовати као а) хидролизирајуће (галотанини и елагитанини); б) комплексне и в) кондензоване танине.

Галотанини су најпростији хидролизирајући танини, који су изграђени од галне

киселине естерификоване најчешће β -D-глюкозом, дајући пентагалоил глюкозу, једињење које представља прототип галотанина. Доста заступљенији хидролизирајући танини у односу на галотанине су елагитанини. Због различитих структурних карактеристика, елагитанине је могуће класификовати на просте елагитанине, C-гликозидне елагитанине са отвореним глюкозним низом, конјугате C-гликозидних танина са флаван-3-олима (комплексни танини) и олигомера који настају интермолекулским повезивањем мономера C-О и C-C везама.⁵⁸ Најпростији елагитанини, као што су телимаграндин и педункулагин (Слика 5), настају интрамолекулским оксидативним купловањем између суседних галоил група у галоилглюкози, градећи хексахидроксидефенилне јединице.



Слика 5. Структуре елагитанина идентификованих у биљци *A. vulgaris*.

Киселом или ензимском хидролизом, прости елагитанини дају елагинску киселину. Друга подгрупа елагитанина, C-гликозидни елагитанини, може се поделити у

две групе у зависности од јединице која учествује у С-повезивању са глукозом. Наиме, уколико у грађењу везе учествују флавогалоил јединице, реч је о типу касталагин елагитанина, док касуаринин тип елагитанина поседује хексахидроксигалоил јединице. Као и у претходним случајевима, и група олигомерних елагитанина (од димера до пентамера) се додатно може поделити на три класе у зависности од типа купловања.

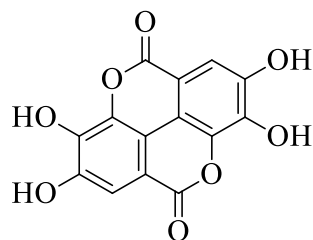
Разликују се олигомери који садрже интермолекулску С-О везу између хексахидроксидифенил јединице једног и галоил групе суседног мономера, дајући валонеил групу или њен оксидовани облик, затим макроциклични олигомери који укључују повезивање две С-О везе и последња група олигомерних елагитанина која настаје специфичним С-С повезивањем β-аномерног угљеника једног мономера и ароматичног прстена другог мономера.

С-С купловањем са катехином или епикатехином формирају се комплексни танини. Проантоцијанидини (кондензовани танини) представљају олигомерне или полимерне облике флаванола (најчешће катехина и епикатехина) и у зависности од типа кондензације разликују се А и Б проантоцијанидини. Међусобним повезивањем мономерних јединица танина C2-C7 и C4-C8 везом (ређе C4-C6 везом), формирају се проантоцијанидини А типа, док танини Б типа настају изостајањем C2-C7 везе.^{59,60}

2.3. Фенолни профил и биолошке активности биљке *A. vulgaris*

Широком спектру биолошких активности вирка и других врста рода *Alchemilla* највише доприноси хемијски профил, у којем је у највећој мери заступљена елагинска киселина⁶¹, затим флавоноиди и њихови гликозиди, фенолне киселине и танини.⁶¹⁻⁷⁰ Елагинска киселина (C₁₄H₆O₈, *Слика 6*), димер галне киселине, најзаступљенија је у потфамилији Rosoideae, којој припада и род *Alchemilla* и представља основни хемотаксономски маркер приликом идентификације биљака ове потфамилије.⁷¹ У биљкама се појављује у слободном облику или у облику гликозида, али најчешће у виду водорастворних елагитанина, где је естерификована шећерима, углавном глукозом.⁷² У великом проценту је присутна у црвеном воћу, орасима, грожђу, поморанцама и другим природним изворима.⁷³

Осушен надземни део вирка (*Alchemillae herba*) садржи минимум 6% танина, изражено у еквивалентима пирогалола. Детаљан приказ досадашњих литературних података који се односе на фитохемијску анализу једињења у роду *Alchemilla* представљен је у оквиру *Табеле 5*.



Слика 6. Структура елагинске киселине.

Табела 5. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода *Alchemilla* L.

Класа и назив фенолног једињења	Биљна врста	Референца
<u>Фенолне киселине и деривати</u>		
<u>Хидроксициметне киселине</u>		
<i>p</i> -Кумарна киселина	<i>A. vulgaris</i> L.	61,74
	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
Синапинска киселина	<i>A. vulgaris</i> L.	61
	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
Кафеинска киселина	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
	<i>A. vulgaris</i> L.	74
<i>trans</i> -Циметна киселина	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
	<i>A. vulgaris</i> L.	74
Рузмаринска киселина	<i>A. vulgaris</i> L.	61
Хлорогенска киселина	<i>A. vulgaris</i> L.	61,75
<u>Бензоеве киселине</u>		
Гална киселина	<i>A. vulgaris</i> L.	61,64,75
Гентизинска киселина	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
	<i>A. vulgaris</i> L.	74
Протокатехинска киселина	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
	<i>A. vulgaris</i> L.	74
Ванилинска киселина	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
	<i>A. vulgaris</i> L.	74
Салицилна киселина	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
	<i>A. vulgaris</i> L.	74
Сирингична киселина	<i>A. jumrukczalica</i> Pawl.	74
	<i>A. vulgaris</i> L.	74
<u>Деривати бензоевих киселина</u>		
Елагинска киселина	<i>A. vulgaris</i> L.	61,75
<u>Елагитанини</u>		
Педункулагин	<i>A. vulgaris</i> L.	67
Агримонин	<i>A. vulgaris</i> L.	67
Левигатин Ф	<i>A. vulgaris</i> L.	67

Табела 5. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода *Alchemilla* L. (наставак)

Класа и назив фенолног једињења	Биљна врста	Референца
<u>Флавони и њихови деривати</u>		
Лутеолин	<i>A. vulgaris</i> L.	61
Мирцетин	<i>A. vulgaris</i> L.	61
Апигенин-8-С-глюкозид (витексин)	<i>A. armeniaca</i> Rothm.	62
	<i>A. erythropoda</i> Juz.	76
	<i>A. erzincanensis</i> Pawl.	62
	<i>A. ikizdereensis</i> Kalheber	62,76
	<i>A. orduensis</i> Pawl.	62
Лутеолин-8-С-глюкозид (ориентин)	<i>A. armeniaca</i> Rothm.	62
	<i>A. cimilensis</i> Pawl.	62
	<i>A. hirsutiflora</i> (Buser) Rothm.	62
	<i>A. ikizdereensis</i> Kalheber	62,76
	<i>A. orduensis</i> Pawl.	62
Лутеолин-7-О-глюкозид	<i>A. speciosa</i> Buser	77
Лутеолин-7-О-рутинозид	<i>A. speciosa</i> Buser	77
<u>Изофлавони</u>		
Генистеин	<i>A. vulgaris</i> L.	61
Даидзеин	<i>A. vulgaris</i> L.	61
<u>Флаваноли</u>		
Епикатехин	<i>A. vulgaris</i> L.	61,75
Катехин	<i>A. vulgaris</i> L.	75
<u>Флавоноли и њихови деривати</u>		
Кверцетин	<i>A. vulgaris</i> L.	61
Кемферол	<i>A. vulgaris</i> L.	61
Кверцетин-3-О-арабинофуранозид (авикуларин)	<i>A. armeniaca</i> Rothm.	62
	<i>A. bursensis</i> Pawl.	62
	<i>A. cimilensis</i> Pawl.	62
	<i>A. erythropoda</i> Juz.	76
	<i>A. hirsutiflora</i> (Buser) Rothm.	62
Кверцетин-3-О-рутинозид (рутин)	<i>A. ikizdereensis</i> Kalheber	62,76
	<i>A. vulgaris</i> L.	61,63,64
	<i>A. speciosa</i> Buser	77
	<i>A. achtarowii</i> Pawl.	65
Кверцетин-3-О-арабинопиранозид (гујаверин)	<i>A. vulgaris</i> L.	63,78
	<i>A. achtarowii</i> Pawl.	65
Кверцетин-3-О-самбубиозид	<i>A. speciosa</i> Buser	77

Табела 5. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода *Alchemilla* L. (наставак)

Класа и назив фенолног једињења	Биљна врста	Референца
<u>Флавоноли и њихови деривати</u>		
Кверцетин-3-О-рамнозид (кверцитрин)	<i>A. trabzonica</i> Hay.-Ayaz & Beyazoglu	76
	<i>A. orduensis</i> Pawl.	62
	<i>A. hirsutiflora</i> (Buser) Rothm.	62
	<i>A. speciosa</i> Buser	77
Кверцетин-3-О-самбубиозид-7-О-глукозид	<i>A. speciosa</i> Buser	77
Кверцетин-3-О-глукуронид (миквелијанин)	<i>A. coriacea</i> Buser	78
	<i>A. filicaulis</i> Buser	78
	<i>A. glabra</i> Neygenf.	78
	<i>A. mollis</i> (Buser) Rothm.	69
	<i>A. speciosa</i> Buser	77
	<i>A. xanthochlora</i> Rothm.	65,78,79
	<i>A. mollis</i> (Buser) Rothm.	69,80
Кверцетин-3-О-галактозид (хиперозид)	<i>A. orduensis</i> Pawl.	62
	<i>A. oriturcica</i> Pawl.	62,76
	<i>A. persica</i> Rothm.	80
	<i>A. trabzonica</i> Hay.-Ayaz & Beyazoglu	76
	<i>A. vulgaris</i> L.	63
	<i>A. speciosa</i> Buser	77
	<i>A. achtarowii</i> Pawl.	65
Кверцетин-3-О-глукозид (изокверцетин)	<i>A. erythropoda</i> Juz.	76
	<i>A. mollis</i> (Buser) Rothm.	69,80
	<i>A. oriturcica</i> Pawl.	76
Кверцетин-3-О-глукозид (изокверцетин)	<i>A. persica</i> Rothm.	80
	<i>A. trabzonica</i> Hay.-Ayaz & Beyazoglu	76
	<i>A. vulgaris</i> L.	61,63
	<i>A. erzincanensis</i> Pawl.	62
	<i>A. cimilensis</i> Pawl.	62
	<i>A. orduensis</i> Pawl.	62
	<i>A. oriturcica</i> Pawl.	62
	<i>A. bursensis</i> Pawl.	62
	<i>A. vulgaris</i> L.	61,63
	<i>A. speciosa</i> Buser	77
Кемферол-3-О-(6"-р-кумароил)- глюкопиранозид (тилирозид)	<i>A. vulgaris</i> L.	63
	<i>A. speciosa</i> Buser	77
	<i>A. mollis</i> (Buser) Rothm.	69
	<i>A. achtarowii</i> Pawl.	65
Кемферол-3-О-глукозид	<i>A. speciosa</i> Buser	77
Кемферол-3-О-глукуронид	<i>A. speciosa</i> Buser	77

Табела 5. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода *Alchemilla* L. (наставак)

Класа и назив фенолног једињења	Биљна врста	Референца
<u>Флавоноли и њихови деривати</u>		
Госипетин-3-О-глукопиранозил-7-О-рамнопиранизид (синокрасозид Д ₂)	<i>A. mollis</i> (Buser) Rothm.	69
Госипетин-3-О-галактопиранозил-7-О-рамнопиранизид	<i>A. mollis</i> (Buser) Rothm.	69
Госипетин-3-О-рамнопиранизид (родиолгин)	<i>A. mollis</i> (Buser) Rothm.	69

Поред фенолних компонената, које су доминантне у роду *Alchemilla*, савременим лабораторијским анализама установљено је присуство и других класа једињења. Код ендемске врсте *A. tredecimloba* са простора западног Кавказа идентификовано је 15 различитих аминокиселина, од којих је 9 есенцијалних за човека. Установљено је да је глутаминска киселина најзаступљенија (10,28 g/kg биљног материјала), док је метионин присутан у траговима.⁸¹ Гасно-хроматографском анализом 23 биљне врсте рода *Alchemilla* распрострањених на територији Турске изведени су закључци да су линолна (18:2), линолеинска (18:3) и палмитинска киселина (16:0) доминантне масне киселине у испитиваним узорцима. Овакви резултати су очекивани, узимајући у обзир да су незасићене масне киселине, попут линолне и олеинске карактеристичне за све родове у фамилији Rosaceae.⁸²

Надземни део вирка садржи врло малу количину етарског уља, у чијем саставу су доминантни алкохоли (*cis*-3-хексенол и окт-1-ен-3-ол), терпени (линалол, миртенол и α -терпинеол), алдехиди (нонанал), органске киселине (хексадеканска, 2-додеканска киселина), угљоводоници (C₂₁-C₃₁ алифатични угљоводоници) и естри.⁸³

Литературни подаци о биолошкој активности *A. vulgaris* недвосмислено указују на то да ова биљка поседује снажан антиоксидативни капацитет, антипролиферативну активност на нивоу ћелија канцера, као и антимикробну активност. Истраживања спроведена у *in vitro* условима су показала да екстракти *A. vulgaris* поседују изражену способност неутрализације DPPH[•], ABTS^{•+} и супероксид анјон радикала при веома ниским концентрацијама.^{61,84,85} Trouillas и сар.⁸⁴ су такође показали да водено-алкохолни екстракт вирка поседује антиинфламаторни потенцијал инхибирајући ензим 15-липооксигеназу, чиме се онемогућава одигравање липооксигеназног пута метаболизма арахидонске киселине и настајање великог броја медијатора инфламаторних процеса. Резултати испитивања ефекта *A. vulgaris* на зарастање рана⁸⁶ показују да третман

испитиваним екстрактом утиче на интензивнију пролиферацију епителних ћелија коже, јетре и бубрега, без споредних токсичних ефеката на датим ћелијама. Клиничком студијом на пацијентима оба пола различитих старосних доби је такође откривено да спољашња примена гела Aphtarine[®], израђеног на бази 3% екстракта *A. vulgaris* у глицерину доводи до потпуног нестанка афти у устима код већине пацијената за само два дана.⁸⁷ Слично, резултати скорашње студије спроведене од стране Choi et al.⁸⁸ показали су да препарат на бази листова *A. vulgaris* и *Mimosa tenuiflora* подстиче реепитализацију ране смањујући пречник оштећења, поспешујући ангиогенезу и васкуларизацију околног ткива⁸⁹ и/или инхибирајући протеазе (колагеназа) и спречавајући деградацију екстрацелуларног матрикса, чиме се подстиче несметана пролиферација фибробласта и епителних ћелија, која води излечењу ране.⁹⁰ Са друге стране, при великим концентрацијама екстракта ($IC_{50} > 0.5 \text{ mg/mL}$) цитотоксични ефекат се остварује на нивоу В16 ћелијске линије меланома миша.⁸⁴ Сличан закључак изведен је и у испитивању цитотоксичног ефекта ендемских врста из рода *Alchemilla* (*A. erythropoda*, *A. oriturcica*, *A. ikizdereensis*, *A. trabzonica*) на нивоу HeLa ћелија. Наиме, резултати су показали да је цитотоксични ефекат 50% етанолних екстраката испитиваних биљних врста дозно зависан, те да у највишим примењеним дозама (0,2 mg/mL) испољавају токсични, апоптотички и некротички ефекат на нивоу ћелијске линије канцера грлића материце.⁷⁶

Важно је истаћи да снажном биопотенцијалу вирка у највећој мери доприноси фитохемијски профил, будући да је установљено да постоји позитивна корелација између количине елагитанина и антирадикалског капацитета узорака.⁹¹ Поред антиоксидативног потенцијала у *in vitro* и *in vivo* условима^{92,93}, елагитанини и елагинска киселина показују и низ других биолошких активности, као што су инхибиција раста микроорганизама⁹⁴, антипролиферативна активност на нивоу широког спектра ћелијских линија канцера^{95–98}, инхибиторни ефекти на нивоу медијатора инфламације (Nf-κB, TNF-α, IL-6)⁹⁹, као и смањење оксидативних оштећења органа и поновно успостављање хомеостазе организма у стањима хроничних обољења, попут дијабетеса.^{100–103}

2.4. Фенолни профил и биолошке активности биљке *S. hortensis*

Без обзира на то што је чубар веома заступљен у етномедицини и гастрономији као лековита и зачинска биљка, подаци о његовој биолошкој активности су врло оскудни. Досадашња истраживања била су углавном базирана на испитивању хемијског састава и антимикробних својстава етарског уља. Гасно-хроматографске анализе су показале да су

главне компоненте етарског уља биљних врста рода *Satureja* оксидовани монотерпени карвакрол и тимол и монотерпенски угљоводоници α -пинен, γ -терпинен и *p*-цимен^{104–116}, а да његов састав и процентуална заступљеност одређених једињења највише зависе од климатских фактора, наводећи као пример главну компоненту карвакрол, чији је садржај био највећи у регионима са високом надморском висином.¹¹⁷ Базирајући се на истраживањима спроведеним у различитим истраживачким групама, може се тврдити да етарско уље биљке *S. hortensis* има изузетан антимикуробни потенцијал, делујући на широк спектар Грам позитивних и Грам негативних бактерија, као и гљивица.^{113,118–123} Поред тога, етарско уље налази примену и у пољопривредне сврхе, будући да показује изражена хербицидна својства те се као такво користи за сузбијање корова.¹²⁴

Резултати испитивања екстракта биљних врста рода *Satureja* L. су ограничени и до сада је познато да биљке које припадају овом роду садрже велике количине рузмаринске киселине.^{125–128} Ćetković и сарадници¹²⁹ су доказали присуство (-)-епикатехина и ($\pm$)-катехина у етилацетатном екстракту *S. montana*, док се у раду Gohari и сар.¹³⁰ наводи да екстракт *S. atropatana* садржи флавоноиде лутеолин, тимонин, 5-дезметоксинобилетин и 5,6,3'-трихидрокси-7,8,4'-триметоксифлавонол. Присуство лутеолина у врстама рода *Satureja* представљено је и у раду De Rojas и сар.¹³¹, при чему су у испитиваној врсти *S. oborvata* доказани још и нарингенин и ериодиктиол. У фитохемијском профилу чубра посебно се истиче присуство велике количине рузмаринске киселине, флавонола, флавонола и њихових гликозида, као и других фенолних једињења.^{126,132–134} Преглед литературних навода у којима су обрађени фитохемијски профили екстракта биљних врста из рода *Satureja* представљени су у оквиру Табеле 6.

Табела 6. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода *Satureja* L.

Класа и назив фенолног једињења	Биљна врста	Референца
<u>Фенолне киселине и деривати</u>		
<u>Бензоеве киселине</u>		
Гална киселина	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. montana</i> L.	136
<i>p</i> -Хидроксибензоева киселина	<i>S. hortensis</i> L.	133
	<i>S. thymbra</i> L.	135
Ванилинска киселина	<i>S. hortensis</i> L.	133
	<i>S. thymbra</i> L.	135
Сирингична киселина	<i>S. hortensis</i> L.	133
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
	<i>S. montana</i> L.	136
Протокатехинска киселина	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. kitaibelii</i> (Wierzb. ex Heuff) P.W.Ball	138
<u>Деривати бензоевих киселина</u>		
Елагинска киселина	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
<u>Хидроксициметне киселине</u>		
Кафеинска киселина	<i>S. hortensis</i> L.	133,139
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. macrosterma</i> (Benth.) Briq.	140
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. coeruela</i> Janka.	141
	<i>S. cilica</i> P.H.David	141
	<i>S. kitaibelii</i> (Wierzb. ex Heuff) P.W.Ball	138
	<i>S. montana</i> L.	136
Ферулна киселина	<i>S. hortensis</i> L.	133,139
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. coeruela</i> Janka.	141
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
	<i>S. montana</i> L.	136
<i>trans</i> -Циметна киселина	<i>S. thymbra</i> L.	135
<i>p</i> -Кумарна киселина	<i>S. hortensis</i> L.	133,139
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
Синапинска киселина	<i>S. hortensis</i> L.	133
	<i>S. thymbra</i> L.	135

Табела 6. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода *Satureja* L. (наставак)

Класа и назив фенолног једињења	Биљна врста	Референца
<u>Естри хидроксициметних киселина</u>		
Рузмаринска киселина	<i>S. hortensis</i> L.	132,133,137,139,142
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. coeruela</i> Janka.	141
	<i>S. cilica</i> P.H.David	141
	<i>S. macrosterma</i> (Benth.) Briq.	140
	<i>S. montana</i> L.	136,143
	<i>S. subspicata</i> Vis.	143
Хлорогенска киселина	<i>S. hortensis</i> L.	133
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. macrosterma</i> (Benth.) Briq.	140
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
	<i>S. kitaibelii</i> (Wierzb. ex Heuff) P.W.Ball	138
<u>Флавоени и њихови деривати</u>		
Лутеолин	<i>S. hortensis</i> L.	133,139
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
	<i>S. montana</i> L.	136
Апигенин	<i>S. hortensis</i> L.	133,139
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. cilica</i> P.H.David	141
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
Мирицетин	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
Диосметин	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
Апигенин-8-С-глукозид (витексин)	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
Апигенин-7-О-глукозид (апигетрин)	<i>S. hortensis</i> L.	144
Лутеолин-7-О-глукозид (цинарозид)	<i>S. kitaibelii</i> (Wierzb. ex Heuff) P.W.Ball	138
	<i>S. hortensis</i> L.	144
Апигенин-7-О-рутинозид	<i>S. hortensis</i> L.	144
<u>Флавоноли и њихови деривати</u>		
Кверцетин	<i>S. hortensis</i> L.	133
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
	<i>S. cilica</i> P.H.David	141
	<i>S. montana</i> L.	136
Кемферол	<i>S. hortensis</i> L.	133
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137

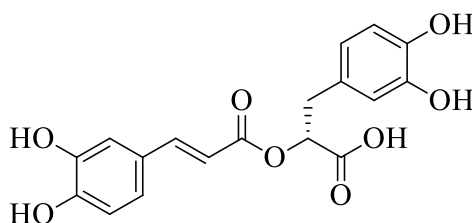
Табела 6. Литературни преглед досадашњих сазнања о фенолном профилу биљних врста рода *Satureja* L. (наставак)

Класа и назив фенолног једињења	Биљна врста	Референца
<u>Флавоноли и њихови деривати</u>		
Кверцетин-3-О-глукозид (изокверцетин)	<i>S. kitaibelii</i> (Wierzb. ex Heuff) P.W.Ball	138
Кверцетин-3-О-рутинозид (рутин)	<i>S. hortensis</i> L.	133,139
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. montana</i> L.	136
Хесперидин	<i>S. hortensis</i> L.	139
	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. coeruela</i> Janka.	141
	<i>S. cilica</i> P.H.David	141
Нарингенин	<i>S. hortensis</i> L.	133
	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. coeruela</i> Janka.	141
	<i>S. cilica</i> P.H.David	141
	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
Ериодиктиол	<i>S. subspicata</i> Vis.	137
	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. coeruela</i> Janka.	141
	<i>S. cilica</i> P.H.David	141
Нарингин	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. coeruela</i> Janka.	141
<u>Флаваноли и њихови деривати</u>		
Епикатехин	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. hortensis</i> L.	139
Катехин	<i>S. thymbra</i> L.	135
	<i>S. hortensis</i> L.	139
	<i>S. icarica</i> P.H.David	141
	<i>S. coeruela</i> Janka.	141
Епигалокатехин-галат	<i>S. thymbra</i> L.	135

Досадашња испитивања биолошке активности екстракта чубра углавном су била усмерена ка процени антиоксидативног потенцијала у *in vitro* условима. Низом студија је показано да етанолни екстракт чубра испољава изузетну способност неутрализације DPPH[•] и ABTS^{•+} радикала, као и способности редукције гвожђа при ниским концентрацијама.^{133,145} Ови резултати потенцијално могу бити од великог значаја у прехранбеној индустрији. Наиме, Madsen и сарадници¹⁴⁶ и каснија истраживања спроведена од стране Aksu и Özer¹⁴⁷ открила су да присуство екстракта *S. hortensis* у млевеном месу продужава његов рок трајања инхибирајући липидну пероксидацију и раст бактерија, те стога чубар може бити употребљен као природни

конзерванс у свежем меду и производима добијеним од њега. Обећавајући резултати добијени су у експериментима спроведеним у *in vivo* условима – седмодневни третман воденим екстрактом надземног дела чубра снижава ниво глукозе у крви за око 30%, па је стога овај екстракт енкапсулиран у виду препарата Saturin, чија је употреба у сврхе лечења инсулин-независног типа дијабетеса (тип II) правно регулисана и одобрена у Грузији.¹²⁵ Поред тога, водени екстракт *S. hortensis* испољава протективни ефекат и на нивоу оксидативног оштећења лимфоцита пацова узрокованог H_2O_2 .¹⁴⁸ Иако у традиционалној медицини постоји веома мало индикација о примени чубра у третману кардиоваскуларних обољења, новија истраживања дају повода да се размотри и овај вид биолошке активности, будући да водени екстракт инхибира агрегацију тромбоцита и секрецију протеина у крвним плочицама испољавајући антикоагулативни ефекат.¹⁴⁹

Иако недовољно истражен у погледу хемијског састава, поједине студије су показале да је за чубар, али и род *Satureja*, карактеристично присуство рузмариנסке киселине.^{139,150} Структурно, рузмаринска киселина (други назив лабиатенска киселина, *Слика 7*) припада групи хидроксициметних киселина и представља естар кафеинске и 3,4-дихидроксифенил млечне киселине. Карактеристична је за потфамилију Nepetoideae у оквиру фамилије Lamiaceae, којој поред рода *Satureja* припадају још и оригано, мајчина душица, нана и рузмарин, из којег је првобитно и изолована.¹⁵¹



Слика 7. Структура рузмариנסке киселине.

Досадашња истраживања су показала да присуство рузмариנסке киселине у зачиницама и лековитом биљу у великој мери доприноси широкој лепези биолошких активности. Претходним студијама је доказано да рузмаринска киселина поседује антиоксидативно деловање у *in vitro* и *in vivo* условима^{152,153}, захваљујући присуству две вициналне хидроксил групе на ароматичним прстеновима (катехол групе) које омогућавају интрамолекулска водонична повезивања између водоника из хидроксилне групе и феноксил радикала рузмариנסке киселине, доприносећи на тај начин стабилности њеног радикалног облика.¹⁵⁴ Поред антиоксидативне активности, рузмаринска киселина значајно доприноси инхибицији биосинтетских реакција настајања проинфламаторних цитокина, што је један од узрока запаљенских реакција у организму.^{155,156} Механизам антиканцерогеног деловања рузмариנסке киселине на канцере дебелог црева, јажника,

дојке и плућа укључује, поред инхибиције пролиферације ћелија и индукције апоптотичких путева у ћелијама канцера, и претходно поменуто антиоксидативно и антиинфламаторно деловање.¹⁵⁷ Такође, поједина истраживања показала су да рузмаринска киселина поседује и антидепресивно деловање, као и протективну улогу у случају Алцхајмерове болести, инхибирајући агрегацију тау протеина у неурофибриларном чвору, што је једно од основних клиничких манифестација овог типа деменције.¹⁵⁸

2.5. Биосинтеза фенолних једињења испитиваних биљака

Фенолна једињења у биљкама настају помоћу три биосинтетска пута: 1) циклусом шикимске киселине (геранил фенилпропаноидни пут биосинтезе), 2) ацетатно-малонатним циклусом (ацетогенински пут биосинтезе) и 3) мешовитим биосинтетским путем.

Фенолне киселине су једна од најбројнијих класа фенолних једињења заступљених у биљкама и структурно представљају деривате циметне и бензоеве киселине. У биљкама *A. vulgaris* и *S. hortensis* фенолне киселине су једне од доминантних компонената. Њихова биосинтеза започиње још у току катаболизма угљених хидрата, при чему настају кључне компоненте потребне за синтезу фенолних једињења. Током фосфоглуконатног пута, алтернативног пута метаболизма глукозе којим се обезбеђује NADPH за биосинтетске реакције, синтетише се тетроза, D-еритроза-4-фосфат, док фосфоенолпируват настаје процесом гликолизе. Реакцијом алдолне кондензације између D-еритроза-4-фосфата и фосфоенолпирувата (Схема 1), настаје 3-деокси-D-арабино хептулозонска киселина-7-фосфат, која подлеже *trans*-6,7-елиминацији фосфатне групе и даље интрамолекулском алдолном кондензацијом у киселој средини даје 3-дехидрохинску киселину, чијом редукцијом у присуству ензима настаје хинска киселина. *Sin*-елиминацијом воде и алдолном циклизацијом из 3-дехидрохинске киселине настаје интермедијерно једињење 3-дехидрошикимска киселина, која активношћу шикимат-3-дехидрогеназе (NADPH коензим) даје шикимску киселину. Дехидратацијом и енолизацијом 3-дехидрошикимске киселине настаје протокатехинска киселина. Поред ње, оксидацијом 3-дехидрошикимске киселине настаје гална киселина, која припада групи деривата хидроксibenзоеве киселине. Естерификација галне киселине глукозом води настанку прекурсора гало- и елагитанина, активираних форме галне киселине- β -глукогалина (1-O-галоил- β -D-глукопираноза), који даљим везивањем јединица галне киселине даје пентагалоил глукозу. Оксидацијом овог једињења даље настаје телимаграндин II, чијом хидролизом настаје хексахидроксидифенска киселина, која спонтано лактонизује формирајући елагинску киселину.¹⁵⁹⁻¹⁶¹

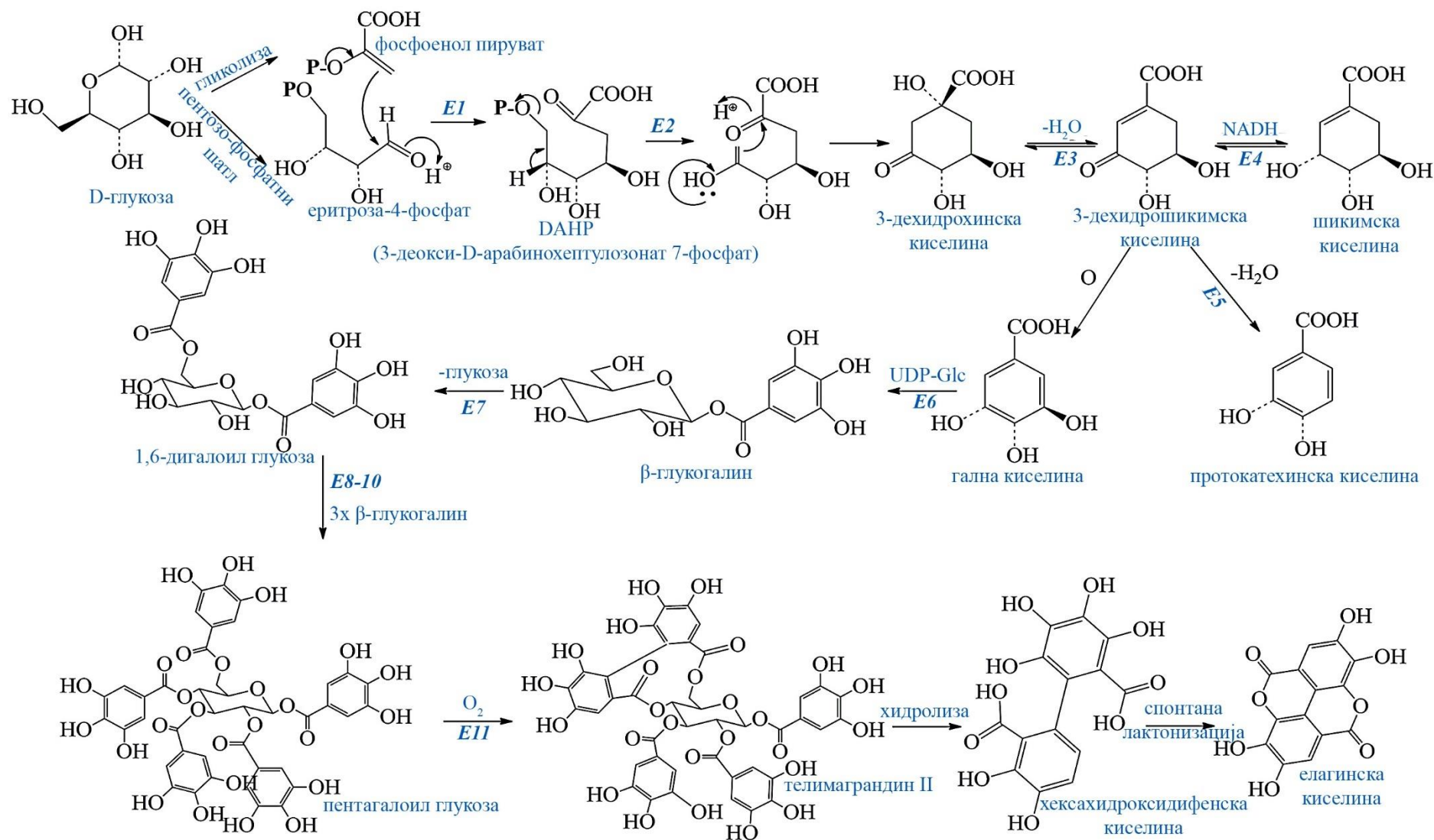


Схема 1. Биосинтеза елагинске киселине. UDP-Glc - уридин дифосфат глюкоза. Ензими: E1 - DAHP синтаза; E2 - 3-дехидрохинат синтаза; E3 - 3-дехидрохиназа, E4 - шикимат дехидрогеназа; E5 - 3-дехидрошикимат дехидратаза; E6 - галат-1β-глюкозил трансфераза; E7 - β-глюкогалин-О-галоил трансфераза; E8 - 10-галоил трансферазе; E11 - пентагалоилглюкоза:O₂ редуктаза (адаптирано^{160,162}).

У гастроинтестиналном тракту, елагинска киселина и елагитанини подлежу реакцијама отварања и уклањања једног лактонског прстена и декарбоксилацији и дехидроксилацији, чиме настају крајњи продукти њиховог метаболизма, метаболити дибензопиран-6-она, уролитини. Прво једињење које настаје у метаболизму елагинске киселине представља уролитин М5, а уклањањем једне хидроксилне групе М5 настају тетрахидрокси уролитини Е, Д и М6, који се трансформишу до трихидрокси-уролифина (Ц и М7), а затим до изоуролифина А и уролифина А и Б, који се могу детектовати *in vivo* у плазми и урину (Схема 2). Даља деградација уролифина отварањем другог лактонског прстена за сада није идентификована.¹⁶³ Кључне чиниоце ових метаболичких трансформација представљају гастроинтестиналне бактерије означене заједничким називом микробиота, а које припадају фамилији Coriobacteriaceae, сојевима *Gordonibacter urolithinifaciens* и *Gordonibacter pamelaee*.¹⁶⁴ У танком цреву започињу реакције хидролизе елагитанина и ослобађање елагинске киселине при неутралној до благо алкалној рН вредности (7,0-7,3). Хипотетички, разградња се не одиграва у желуцу због високе стабилности елагитанина при ниским рН вредностима. Тако настали интермедијери се трансформишу у уролитине у дебелом цреву. Концентрација ових метаболита у системској циркулацији је знатно виша од концентрације елагинске киселине, будући да се трансформацијама повећава њихова хидрофилност и апсорпција, али је њихова антиоксидативна активност мања у поређењу са елагинском киселином.¹⁶⁵ Уролитини потом подлежу реакцијама друге фазе биотрансформације, које обухватају конјуговање са две или три јединице глукуронске киселине (глукуронидација) и сулфатом (сулфатација), као и реакције метиловања. Уролитини А и Б се екскретују примарно путем урина и фецеса.^{73,166} Ипак, приликом тумачења метаболизма елагинске киселине и елагитанина треба бити обазрив. Ова тематика је веома актуелна у савременој науци, али за сада остаје неразјашњено неколико питања. Прво од њих: да ли је могуће да се хидролиза елагитанина одиграва при физиолошким условима без учешћа гастроинтестиналних бактерија које продукују специфичне ензиме таназе који хидролизују естарску везу елагитанина? Поред тога, потребно је установити и да ли уролитини могу бити формирани директно деградацијом елагитанина или је ипак потребно да елагитанини најпре хидролизују до елагинске киселине.¹⁶⁷

Рузмаринска киселина је карактеристична за многе фамилије биљака (Ариасеае, Boraginaceae, Heliotropiaceae), а у оквиру фамилије Lamiaceae присутна је једино у потфамилији Nepetoideae.¹⁶⁸

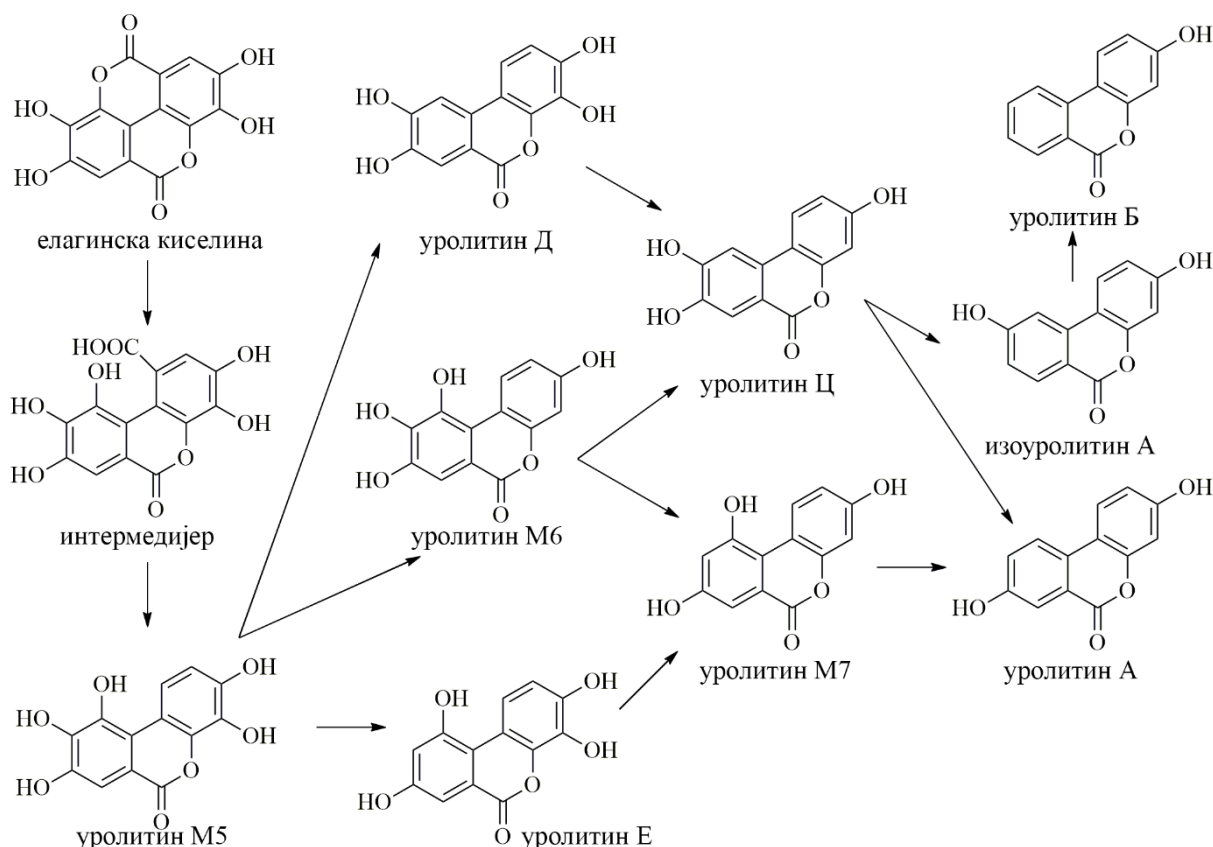


Схема 2. Претпостављени метаболизам елагинске киселине и структуре њених метаболита (адаптирано¹⁶⁹).

Хемијски посматрано, рузмаринска киселина представља естар кафеинске и 3,4-дихидроксибензил-млечне киселине. Биосинтеза рузмаринске киселине започиње ароматичним аминокиселинама. Ове аминокиселине настају већ споменути шикиматним путем (Схема 3). Наиме, фосфорилацијом шикимске киселине каталитичком активношћу шикимат киназе, уз АТП као кофактор, настаје шикимат-3-фосфат. Укључивањем фосфоенолпирувата награђује се 5-енолпирувилшикимат-3-фосфат, који ослобађањем фосфатне групе даје хоризмат, кључни прекурсор синтезе ароматичних аминокиселина, а самим тим и широког спектра секундарних метаболита биљака. За биосинтезу аминокиселина са ароматичним бочним низом кључна су два пута ензимске модификације хоризмата. Први подразумева изомеризацију хоризмата у префенат, коју катализује хоризмат мутаза, при чему настају интермедијери који уз учешће ензима награђују фенилаланин и тирозин. Триптофан се, пак, синтетише превођењем хоризмата у антранилат, који потом подлеже низу ензимских реакција дајући аминокиселину као крајњи производ. У биосинтези рузмаринске киселине кључну улогу имају фенилаланин и тирозин.

Деаминација L-фенилаланина каталитичком активношћу фенилаланин-амонијум лијазе (PAL) води настанку прве, најпростије фенилпропанске структуре, циметне киселине. Хидроксилацијом у положају C-4 настаје *p*-кумарна киселина, из којих код виших биљака низом реакција може да настане велики број C₆-C₃ структура са различитим модификацијама на ароматичном прстену. Како циметне киселине захтевају активацију, награђује се тиоестар са коензимом А, који представља први прекурсор у синтези рузмаринске киселине (*p*-кумароил-коензим А). Формирањем естарске везе између алифатичне хидроксилне групе *p*-хидроксифенилацетата и карбоксилне групе *p*-кумароил-коензима А (након ослобађања коензима А) настаје *p*-кумароил-4'-хидроксифенил млечна киселина. Ова реакција је катализована ензимом синтаза рузмаринске киселине. Увођењем хидроксилних група у позицијама 3 и 3' ароматичног прстена деловањем цитохром Р450 монооксигеназа, настаје рузмаринска киселина (Схема 4).^{160,170}

p-Кумароил-коензим А може даље да се трансформише низом ензимских реакција до широког спектра фенолних једињења (лигнина, кумарина, флавоноида; Схема 5). Са друге стране, трансаминацијом тирозина настаје *p*-хидроксифенил пируват, који се редукује до *p*-хидроксифенилацетата уз ензим хидроксифенилпируват редуктаза.

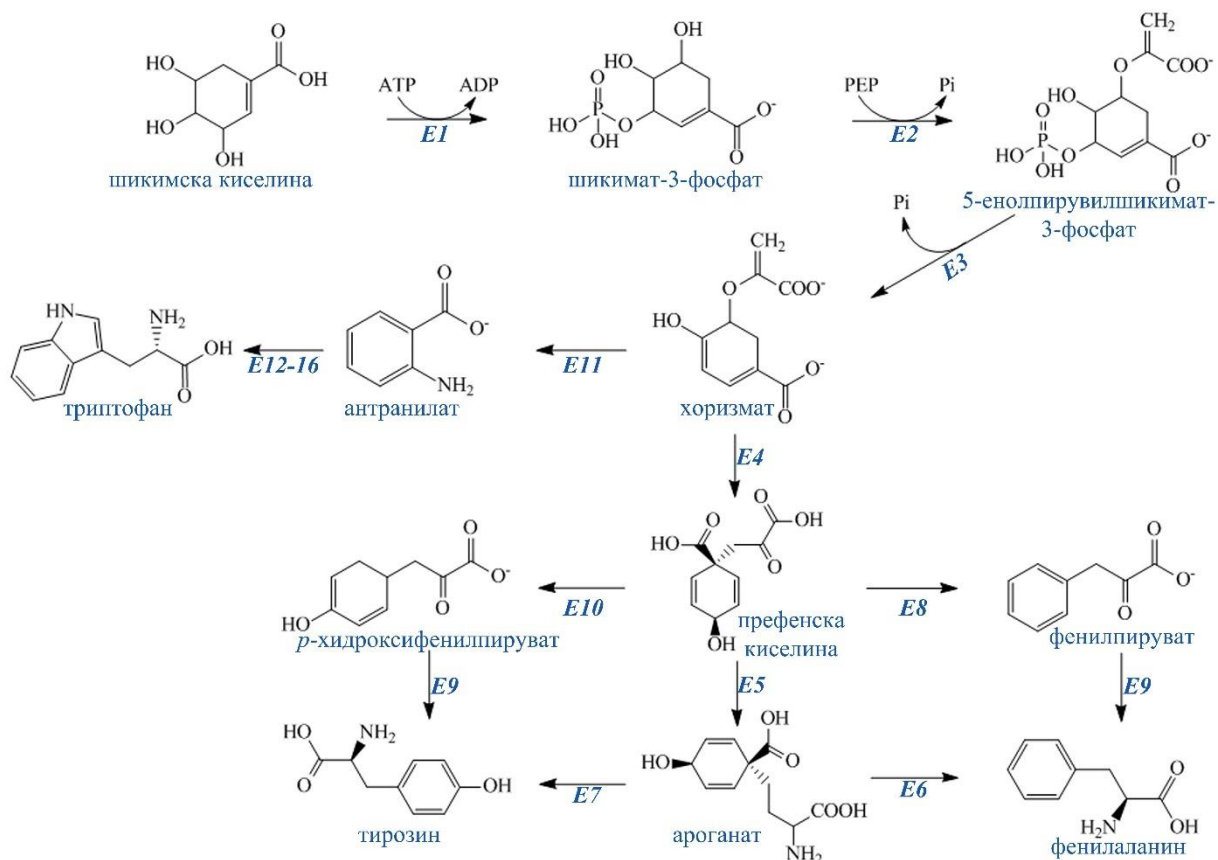


Схема 3. Биосинтеза ароматичних аминокиселина из шикимске киселине. Ензими: E1 - шикимат киназа; E2 - 5-енолпирувилшикимат 3-фосфат синтаза; E3 - хоризмат синтаза; E4 - хоризмат мутаза; E5 - префенат аминотрансфераза; E6 - арогенат дехидратаза; E7 - арогенат дехидрогеназа; E8 - префенат дехидратаза; E9 - ароматична аминотрансфераза; E10 - префенат дехидрогеназа; E11 - антранилат синтаза; E12 - антранилат фосфорибозилтрансфераза; E13 - фосфорибозил антранилат изомераза; E14 - индол-3-глицерол фосфат синтаза; E15, E16 - триптофан синтаза (модификовано¹⁷¹).

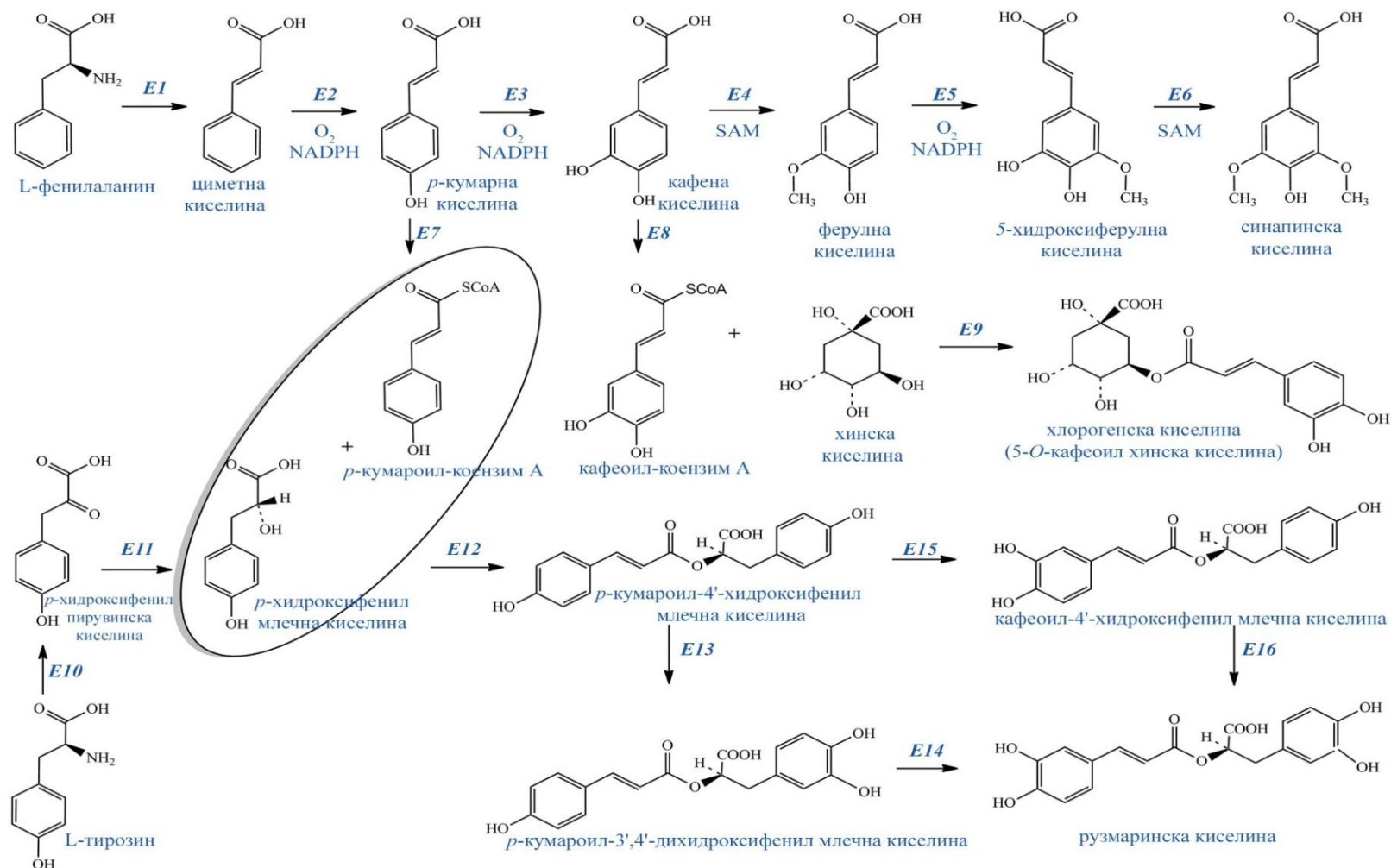


Схема 4. Биосинтеза фенолних киселина и рузмаринске киселине. Ензими: E1 - фенилаланин-амонијум лијаза; E2 - 4-хидроксилаза циметне киселине; E3 - p-кумароил-3-хидроксилаза; E4 - катехол-О-метилтрансфераза; E5 - ферулат-5-хидроксилаза; E6 - катехол-О-метилтрансфераза; E7 - p-кумарна киселина-СоА лигаза; E8 - кафеоил-СоА лигаза; E9 - хидроксицинамил-СоА-хинат-хидроксицинамил трасфераза; E10 - тирозин-аминотрансфераза; E11 - хидроксифенилпируват-редуктаза; E12 - синтаза рузмаринске киселине; E13 - p-кумароил-4'-хидроксифениллактат 3'-хидроксилаза; E14 - p-кумароил-4'-хидроксифениллактат 3-хидроксилаза E15 - p-кумароил-4'-хидроксифениллактат 3-хидроксилаза; E16 - кафеоил -4'-хидроксифениллактат 3'-хидроксилаза. SAM-S-аденозил-метионин.^{160,170}

Пола сата након оралне администрације рузмаринске киселине достиже се њена максимална концентрација у крви (и то метиловане рузмаринске киселине или у виду конјугата са глукуронидом), чиме се указује на брзу апсорпцију у дигестивном тракту, иако још увек није познато да ли ћелије апсорбују рузмаринску киселину пасивним или активним транспортом. Извесна количина кафеинске киселине (у глукуронидној форми), као и ферулне и *m*-кумарне киселине (конјугованих са сулфатима) детектована је у урину осам часова након оралне администрације рузмаринске киселине, па се може сматрати да се њена метаболичка деградација одиграва до наведених деривата хидроксициметних киселина.¹⁷²

Флавоноиди су мешовитог биогенетског порекла - фенилпропанске киселине се активирају деловањем ацетил-СоА и у виду тиоестара са СоА укључују се у ацетатни пут. *p*-Кумарна киселина углавном настаје из фенилаланина деловањем фенилаланинамонијум лијазе, док у појединим биљкама ово једињење настаје из тирозина активношћу тирозинамонијум лијазе.¹⁷³ Елонгацијом бочног низа помоћу три активираних јединице малонил-СоА, уз каталитичку активност халкон-синтазе формира се поликетидни низ, чијим увијањем настају А и Б прстен основног скелета флавоноида (Схема 5). Деловањем халкон изомеразе формира се Ц прстен, дајући интермедијерни флаванон нарингенин. Флавоноиди, као што су апигенин и лутеолин, настају из нарингенина каталитичком активношћу флавоноид синтазе. Хидроксилација нарингенина води настајању дихидрофлавонола, чијом редукцијом настају леукоантоцијанидини. Са друге стране, дихидрофлавоноли подлежу и реакцијама оксидације коју катализује флавоноид синтаза дајући одговарајуће флавоноле. Редукцијом леукоантоцијанидина настају антоцијанидини (Схема 5). Увођењем гликозил, ацил и метил група у структуру антоцијанидина настају антоцијани, док редукцијом настају флаваноли (катехини), чија полимеризација води настанку проантоцијанидина.

Посебна класа флавоноида, изофлавоноиди, настаје из флаванона, миграцијом Б прстена са позиције 2 у 3, што је праћено хидроксилацијом у положају 2. Ова реакција је омогућена присуством изофлавоноид синтазе, ензима из групе цитохром Р450 ензима, при чему прво бива награђен 2-хидроксиизофлавоноид, који се потом спонтано или ензимски дехидратише дајући одговарајући изофлавоноид.¹⁷⁴

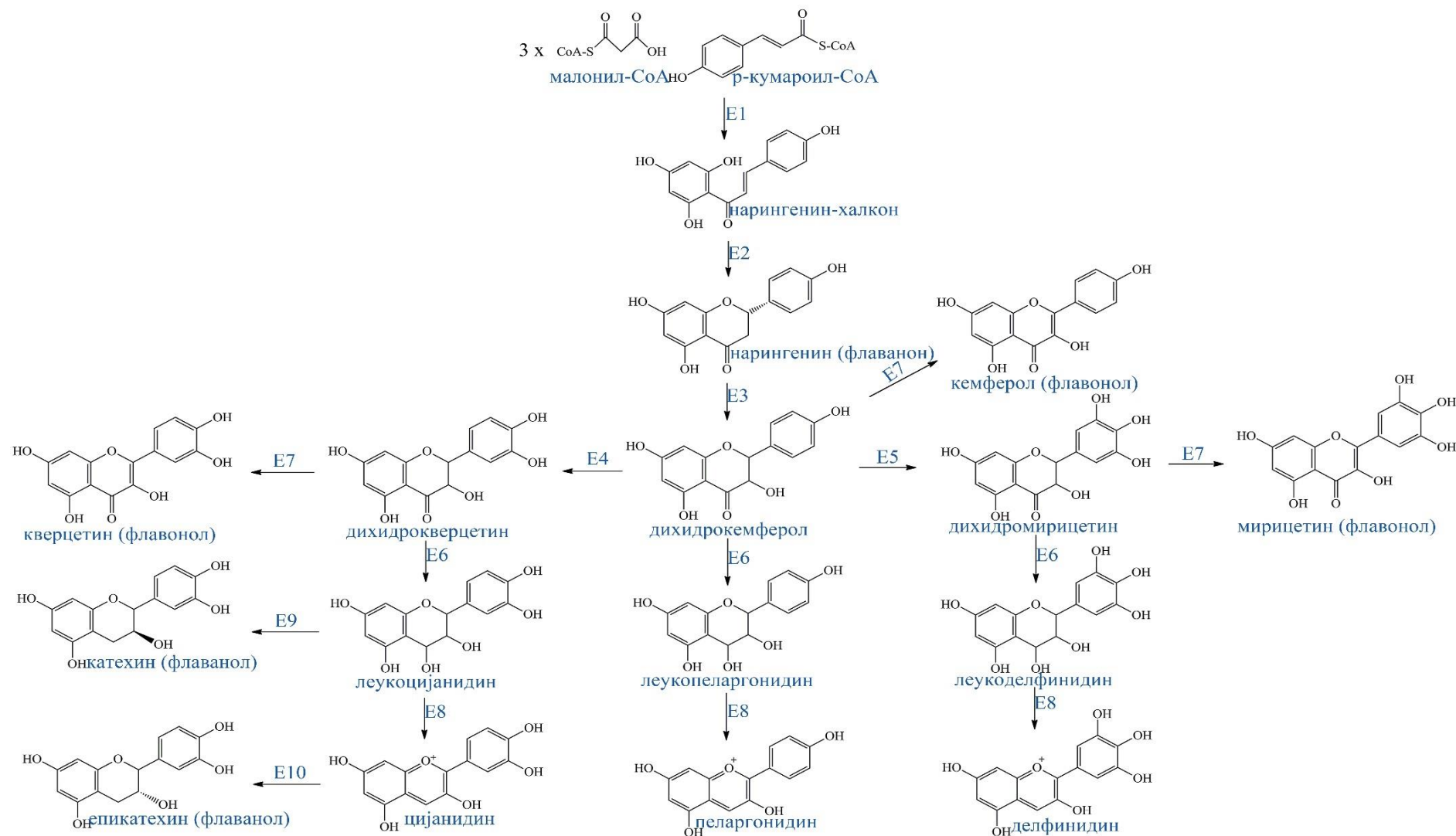


Схема 5. Биосинтеза различитих класа флавоноидних једињења. Ензими: E1 - халкон синтаза; E2 - халкон изомераза; E3 - флаванон-3-хидроксилаза; E4 - флавоноид-3'-хидроксилаза; E5 - флавоноид-3',5'-хидроксилаза; E6 - дихидрофлаванол-4-редуктаза; E7 - флавонол синтаза; E8 - антоцијанидин синтаза; E9 - леукоцијанидин редуктаза; E10 - антоцијанидин редуктаза.^{175,176}

2.6. Биолошки потенцијал лековитих биљака и фенолних једињења

2.6.1. Антимикробна активност

2.6.1.1. Инфекције микроорганизама и резистентност на антимикробне лекове

Савремена медицина сусреће се са озбиљним глобалним проблемом лечења респираторних, гастроинтестиналних и других здравствених инфекција, као и тровања храном, чији су узрочници бактерије и гљиве. Разлог томе је развијена отпорност микроорганизама према постојећим конвенционалним лековима који укључују широк спектар антибиотика и антифунгалних агенаса. Светска здравствена организација је 2014. године микробну резистентност означила као горући проблем савременог друштва који годишње однесе преко 25000 живота у Европи.¹⁷⁷

Резистентност бактерија и гљивица (квасаца и плесни) подразумева способност њихове репликације у присуству антимикробних једињења које би требало да зауставе и онемогуће њихово даље размножавање. Појављује се у три облика: унутрашња, стечена и адаптивна резистенција.^{178,179} Први тип резистенције, *унутрашња отпорност*, урођена је и генетски детерминисана карактеристика соја која се манифестује неосетљивошћу на одређени антимикробни агенс или групу једињења са истим механизмом деловања и није условљена претходном изложеношћу микроба датом агенсу.¹⁸⁰ Поједине бактерије толерантност према антибиотцима остварују путем посебних хромозомски кодираних ефлукс пумпи, чија је улога у излучивању антибиотика и смањењу њихове унутарћелијске концентрације.^{181–183} Грам негативне бактерије, попут *Pseudomonas aeruginosa*, у својој структури имају спољашњу мембрану слабе пермеабилности, те они стога поседују протеинске системе - порине путем којих се транспортују антибиотици, али је њихов пролазак селективан и строго одређен величином молекула.^{178,184,185} Поред поменутих механизма, друге бактерије развијају отпорност према антибиотцима путем модификације на кључним ензимима (местима деловања антибиотика), синтезом и продукцијом нових ензима и смањивањем афинитета за везивање антибиотика.¹⁸⁶ На сличан начин се унутрашња резистенција развија код гљивица.¹⁸⁷ Са друге стране, *стечена резистенција* се уочава код сојева чија је колонизација првобитно могла бити заустављена одређеном класом лека, да би се потом услед хромозомских аберација и/или присутности резистентних сојева у њиховој околини развила отпорност према примењеним агенсима.^{188,189} До овог вида отпорности микроорганизама долази

првенствено због ирационалне и често неосноване употребе антимикробних лекова, првенствено антибиотика (сматра се да су антибиотици били погрешно или непотребно преписани као лек у чак 30-60% случајева).¹⁹⁰ Познато је да клинички изолати *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* и поједини сојеви ентерокока и стафилокока представљају неке од најтолерантнијих бактерија на присуство више различитих лекова (енг. *Multi-drug resistance*), због чега се оне често називају и „супербактерије“. За разлику од претходна два вида резистентности која се преносе на следећу генерацију, *адаптивна отпорност* није дугорочна и јавља се само као последица тренутне неосетљивости на антимикробни агенс, а условљена је привременим факторима, те се стога и губи када се спољашњи окидач уклони.^{178,191}

2.6.1.2. Антимикробни агенси из природних извора

Свесни лимитирајућих фактора у терапији инфекција, као и чињенице да је отпорност на вишеструке лекове све присутнија, модерна истраживања су усмерена на алтернативне стратегије у спречавању микробних инфекција. Због богатог и различитог фитохемијског профила, у којем се у значајној мери истичу фенолна једињења, лековите биљке се сматрају једним од најважнијих ресурса природних антимикробних агенаса. Познати руски научник Токин (Борис Петровић Токин) је још тридесетих година XX века открио да биљке поседују компоненте које могу деловати бактерицидно или бактериостатски и означио их као *фитонциде*, да би се тај термин данас проширио на сва једињења у вишим биљкама која показују антимикробну активност на сојевима гљива и бактерија.^{192,193} Атрактивности истраживања лековитог биља такође значајно доприноси и податак да у досадашњој литератури не постоје подаци који указују да микроорганизми развијају резистентност према екстрактима лековитог биља¹⁹⁴, док је ретка резистентност која се јавља према специфичним једињењима изолованим из њих.¹⁹⁵ Бројна истраживања су показала да екстракти биљака које су богате полифенолима доприносе инхибицији раста бактерија и развоја болести, попут инфекције бактеријом *Helicobacter pylori*.¹⁹⁶ Експериментално је потврђено да екстракти и/или етарска уља лековитог биља, као што су рузмарин (*Rosmarinus officinalis*), црни пелин (*Artemisia vulgaris*) и различите врсте рода тимијана (*Thymus*) поседују антимикробна својства према широком спектру сојева микроорганизама.^{197–200}

Поред терпена, као најпотентнијих једињења присутних у етарском уљу, полифенолна једињења из биљних екстраката заузимају значајно место као инхибитори раста микроорганизама.^{201–203} Иако је ова биолошка активност потврђена за многобројне

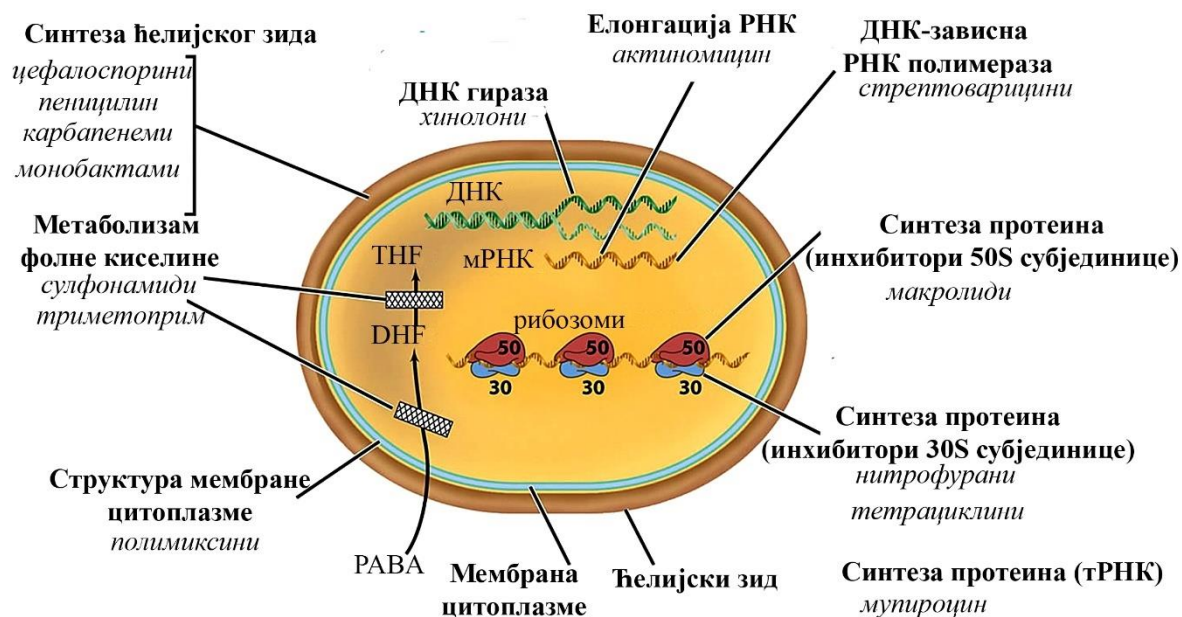
феноле, и даље се трага за потпуним расветљавањем механизма деловања и кључних група у структури већине фенолних једињења из природних извора. Анализом односа структуре и активности (енг. *Structure - activity relationship*, SAR) показано је да је антимикробна активност примарно одређена бројем и положајем хидроксилних група у полифенолима. У случају флавонола (кемферол, кверцетин), 4'-ОН у Б-прстену доприноси већој антимикробној потентности, док са друге стране, присуство хидроксилне групе у положају 3', односно 5' утиче на редуковану способност инхибиције раста микроорганизама.²⁰⁴ За халконе, флавоноиде отвореног прстена, најважнија је хидроксилација на Б прстену, у А прстену у положајима 2' и 4', док је у положају 3' у свим активним једињењима ове групе примећено присуство неке липофилне групе, као што је пренил група. Разлог овакве активности лежи у чињеници да присуство хидроксилних група утиче на повећање афинитета везивања халкона за протеине. Халкони се везују за ензимски рецептор којим се регулише раст бактерија, а који се састоји из два сегмента - хидрофобног региона, за који се везује липофилна група из А прстена, и хидрофилног дела, за који се водоничном везом везује хидроксилна група из прстена Б, чиме долази до инхибиције на нивоу ензима микроба.²⁰⁵ Важно је поменути да управо присуство -ОН групе у положају 2' А прстена доприноси стабилизацији основне структуре халкона због могућности грађења водоничне везе. Са друге стране, супституцијом хидроксил групе у положају 2' халкона ацетокси или метокси групом узрокује се смањење инхибиције раста микроорганизама.²⁰⁶

У структури флавона, попут апигенина, лутеолина или бајкалеина, значајну улогу у антимикробној активности има присуство О-ацил или О-алкиламино низа у позицији 7', 5' и 6'-ОН групе, као и геранил групе у 6' и 8' позицији. Слично као и у случају халкона, метокси група доводи до смањења антимикробне активности флаванона, док увођење азота или сумпора у положај 4' Ц прстена флавоноида доприноси редукцији раста микроорганизама.²⁰⁷ Тестирањем осетљивости бактерија на фенолне киселине установљено је да на њихов антимикробни потенцијал највише утиче присуство карбоксилне групе (-COOH) и хидроксилне групе (-OH) у *орто* и *пара* положају, присуство метокси групе (-OCH₃) или водоника на *мета* позицији у бензеновом прстену, као и засићеност бочног остатка фенолних киселина.^{208,209}

Фенолна једињења антимикробни ефекат испољавају путем више различитих механизма деловања (Слика 8):

- ☞ Нарушавање структуре ћелијске мембране (перфорација мембране и/или смањење флуидности мембране, генерисање водоник пероксида);

- Инхибиција синтезе нуклеинских киселина (инхибиција топоизомеразе и/или дихидрофолат редуктазе и ДНК гиразе);
- Инхибиција енергетског метаболизма (редукција NADH-цитохром ц редуктазе, инхибиција АТП синтазе);
- Инхибиција синтезе ћелијског зида (инхибиција D-аланин-D-аланин лигазе) и ћелијске мембране (инхибиција FabG, FabI, FabZ, Rv0636 ili KASIII).



Слика 8. Механизми деловања антимикуробних агенаса (модификовано²¹⁰).

Легенда: ПАВА - *p*-аминобензојева киселина; ТНФ - тетрахидрофолат; ДНФ - дихидрофолат.

Иако су поједини биљни екстракти и једињења изолована из њих показали слаб антимикуробни потенцијал, новија истраживања показују да би они ипак могли бити део терапије и контролисања бактеријских и гљивичних инфекција. Примера ради, бајкалеин примењен самостално испољава слабо деловање на вишеструко резистентне сојеве *S. aureus*, међутим, синергистичким деловањем са β -лактамским антибиотцима, као што су ампицилин и метицилин, дејство антибиотика се знатно побољшава, чиме се смањује ефективна концентрација антибиотика потребна за супресију раста бактеријске ћелије.²¹¹ Примена епигалокатехин-галата, главног састојка зеленог чаја, као и флавонола галангина, изолованог из биљке *Alpinia officinarum*, доприноси антибактеријској активности β -лактамских антибиотика широког спектра деловања.^{212,213} Сличну интеракцију са антибиотцима и фунгицидима испољавају и неки биљни екстракти.²¹⁴⁻²¹⁶

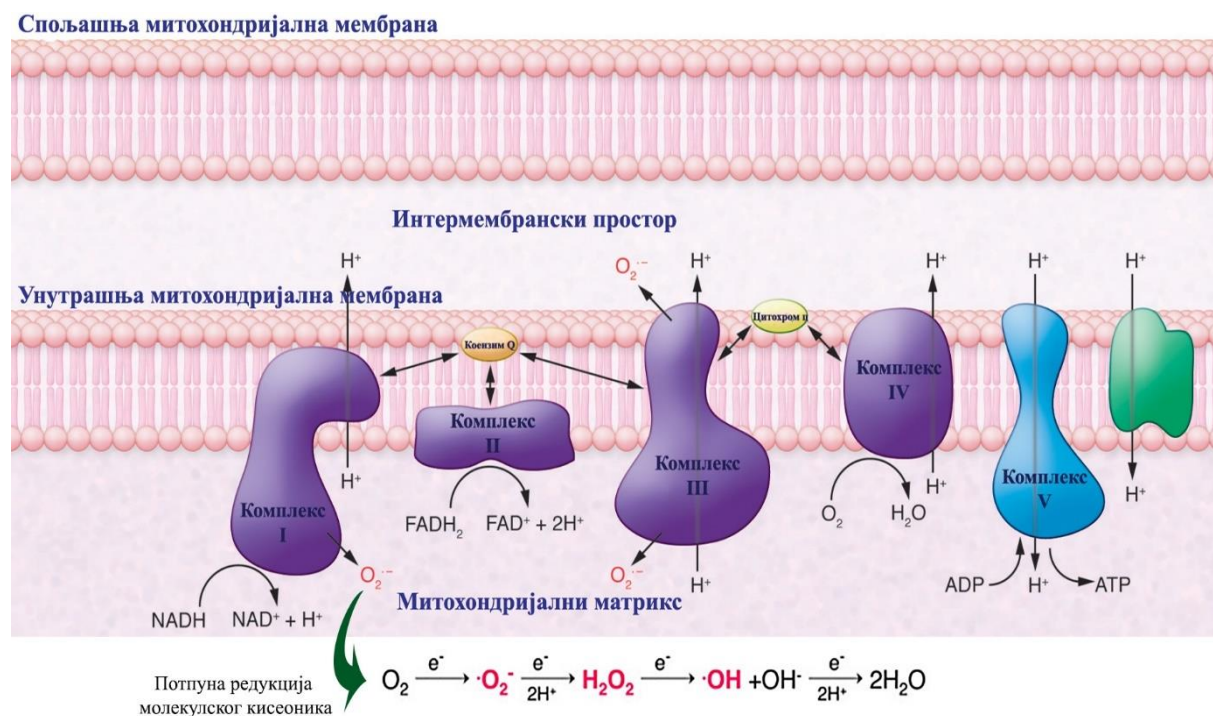
Иако су резултати до сада спроведених истраживања обећавајући у погледу повећања фармакокинетичких и фармакодинамичких особина антибиотика, неопходно

је спровођење системских *in vivo* студија којима би се потврдила нетоксичност антимикробних агенаса и ефикасност оваквог терапеутског приступа.²¹⁷

2.6.2. Антиоксидативна активност

2.6.2.1. Слободни радикали и оксидативни стрес

У живим организмима, кисеоник има улогу пре свега у генерисању енергије у виду молекула аденозин трифосфата (АТФ) процесом оксидативне фосфорилације на унутрашњој митохондријалној мембрани. Молекулски кисеоник је јак оксидант, те стога представља акцептор електрона у електрон-транспортном низу, а сам се постепено редукује до воде (Слика 9). Ипак, око 1-3% кисеоника, уместо редуковања до воде, учествује у генерисању интермедијерних форми кисеоника са неспареним електроном, пре свега супероксид радикала.²¹⁸



Слика 9. Оксидативна фосфорилација у митохондријама и генерисање супероксид радикала (адаптирано из ^{219,220}).

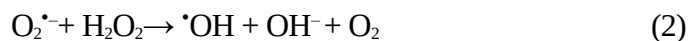
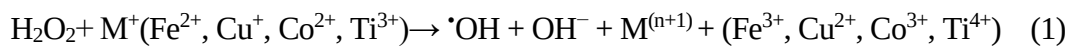
Базирајући се на сазнањима да је стварање реактивних врста кисеоника са неспареним електроном одговорно за токсичност кисеоника, постављена је такозвана теорија о слободним радикалима. Према њој, слободни радикали који настају у процесу ћелијске респирације одговорни су за оксидативна оштећења ћелије, а потом и за њено

старење и смрт, што је условило опсежнија истраживања о њиховом утицају на биолошке системе. Познато је да се слободни радикали стварају у процесу аеробног метаболизма, односно ћелијске респирације и да је синтеза секундарних ћелијских гласника, попут цикличног гуанозин монофосфата (cGMP), условљена учешћем хидроксил радикала ($\cdot\text{OH}$), чиме је потврђена улога кисеоничних врста у биолошким системима.^{221,222}

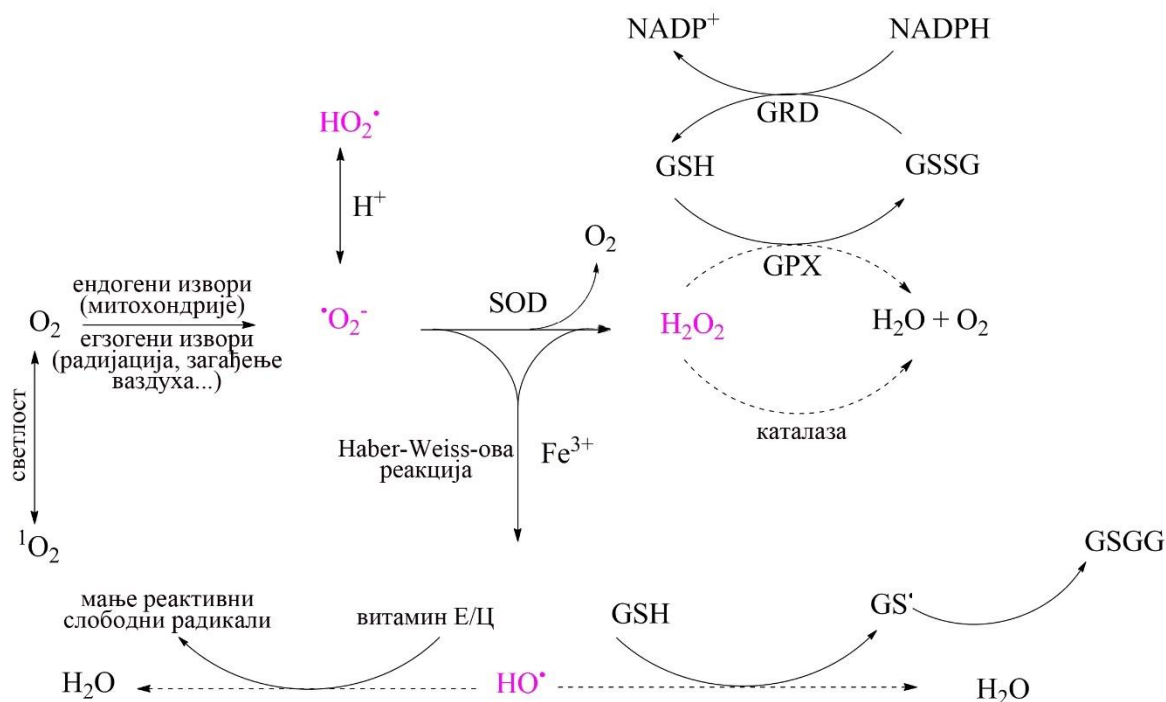
Иако су савремена истраживања усмерена ка продубљивању сазнања о слободним радикалима, експерименти вођени у биолошким системима имају низ препрека. Основни разлог је чињеница да су слободни радикали веома реактивна једињења, али да су врло нестабилни, па је њихова стабилна (енг. *Steady-state*) концентрација у системима веома ниска. Поред тога, они могу учествовати у широком спектру различитих реакција, а њихова концентрација зависи од физиолошког стања организма.

Слободни радикали се дефинишу као „атоми, молекули или јони који поседују један или више неспарених електрона у последњој атомској односно молекулској орбитали“.²²³ Постоји неколико врста слободних радикала, али су за живе организме најважнији они који настају у процесима метаболизма кисеоника и азота (енг. *Reactive oxygen species* (ROS); *Reactive nitrogen species* (RNS)). Најпознатије реактивне врсте кисеоника су његове радикалске форме - супероксидни анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$), хидроксил радикал ($\cdot\text{OH}$), као и нерадикалски облици настали парцијалном редукцијом кисеоника, као што су водоник пероксид (H_2O_2), синглетни кисеоник ($^1\text{O}_2$), озон (O_3) и други²²⁴, док су азот моноксид радикал ($\cdot\text{NO}$) и нерадикалски пероксинитрит ($\text{ONOO}^{\cdot}$) најзначајније реактивне врсте азота.²²⁵ Поред њих, неспарени електрони могу бити присутни на атомима угљеника (алкил радикали) и сумпора (тиол радикали).²²⁶

Извори слободних радикала могу бити двојаки: ендогени (унутрашњи) и егзогени (спољашњи). Ендогени слободни радикали генеришу се примарно у процесу аеробног метаболизма у комплексима I (NADH дехидрогеназа) и III (убихинон цитохром ц редуктаза) електрон-транспортног ланца, тј. у ћелијским органелама (митохондрије, ендоплазматски ретикулум и пероксизоми), где су веома високе концентрације кисеоника. Поред ћелијског дисања, слободни радикали настају и у другим биолошким процесима, као што су фагоцитоза и ензимске реакције катализоване оксидазама (хипоксантин/ксантин оксидаза систем) и ензимима ендоплазматског ретикулума (цитохром P450 и b5 ензими).²¹⁸ Један од најреактивних слободних радикала, $\cdot\text{OH}$ радикал, примарно се у биолошким системима генерише Фентоновом (1) и/или Хабер-Вајсовом реакцијом (2), у којој долази до разградње H_2O_2 катализоване металима променљиве валенце (гвожђе, бакар, кобалт) (Слика 10).^{227,228}



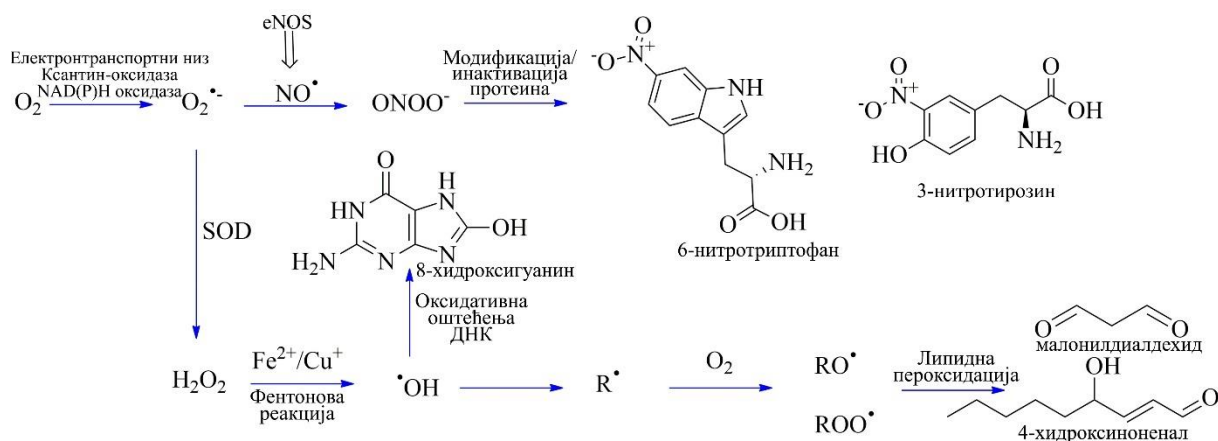
Са друге стране, поред продукције у биолошким системима, стварање слободних радикала може бити узроковано спољашњим факторима, који укључују дувански дим, алкохол, загађења воде, ваздуха и земљишта, пестициде и индустријске раствараче, UV зрачење и присуство тешких метала.



Слика 10. Реактивне кисеоничне врсте у биолошким системима (преузето уз модификације²²⁹).

Легенда: GSH - редуковани глутатион; GSSG - оксидовани глутатион; SOD - супероксид дисмутаза; GPx - глутатион пероксидаза; GRD - глутатион редуктаза.

Међутим, у патолошким случајевима, приликом излагања већ споменутих егзогеним стресорима, попут ксенобиотика и јонизујућег и UV зрачења, слободни радикали се продукују у прекомерним количинама при чему долази до дисбаланса између формирања слободних радикала и њихове неутрализације путем природне антиоксидативне ензимске и неензимске одбране организма, што за последицу има низ негативних ефеката на нивоу ћелије - неензимска гликозилација угљених хидрата и настајање α - и β -дикарбонилних једињења, липидна пероксидација, одмотавање двоструког хеликса ДНК и оксидативна оштећења нуклеинских киселина, примарно на гуанину, хлоровање и нитровање аминокиселина и протеина, губитак ензимске активности (Слика 11).²³⁰⁻²³²



Слика 11. Оксидативна оштећења протеина, ДНК и липидна пероксидација као последица присуства реактивних врста кисеоника и азота (eNOS) (модификовано²³³).

Процес, у литератури познат као оксидативни стрес, дефинише се као стање када су концентрације ROS-а привремено или хронично повишене, док су концентрације ендогених антиоксиданата смањене, што води нарушавању целуларне редокс сигнализације и контроле.^{234,235} Једињења која изазивају алтерације у антиоксидативној заштити организма или генерисање ROS, а самим тим и оксидативни стрес, било да су ендобиотског или ксенобиотског порекла, означена су као прооксиданти. Поједини лекови, попут парацетамола или хемиотерапеутика доводе до промена на нивоу органа, првенствено у уринарном, хепатобилијарном и гастроинтестиналном тракту.²³⁶

Повећан ниво оксидативно модификованих ћелијских компонената, липида, протеина, нуклеинских киселина и глутатиона, посматра се као кључни чинилац у процени нивоа оксидативног стреса.²³⁷ Требало би, пак, узети у обзир да је одговор на оксидативни стрес ткивно специфичан, односно да оштећења одређеног органа не морају нужно носити са собом и оксидативне промене на другим ткивима.²³⁸ Оксидативни стрес се може класификовати према интензитету као базални оксидативни стрес и оксидативни стрес слабог, средњег и јаког интензитета.²³⁹

У стању базалног оксидативног стреса, као и оксидативног стреса слабог интензитета, концентрације слободних радикала су толико ниске да применом постојећих метода није могуће идентификовати било какве негативне промене. Са друге стране, стање умереног оксидативног стреса карактерише се оксидативним оштећењима на виталним компонентама ћелије, као и слабљењем антиоксидативне одбране организма, при чему долази до патолошких стања и озбиљних обољења, попут Алцхајмерове и Паркинсонове болести и кардиоваскуларних обољења, које последично могу довести до стања израженог оксидативног стреса са смртним исходом.^{240,241}

Како би се елиминисала прекомерна количина слободних радикала и неутралисало њихово негативно деловање, аеробни организми, укључујући и људски, имају интегрисани систем „скевинцера“, тј. „хватача“ слободних радикала, који представљају антиоксидативну одбрану организма и заједнички су означени као *антиоксиданти*, а обухватају ензиме и неензимска једињења. Првобитно су антиоксидантима сматрана једињења која спречавају потрошњу кисеоника, те су примењивана у индустријске сврхе.²³² Савремена литература ослања се на дефиницију развијену од стране Халивела (Barry Halliwell), према којој су антиоксиданти *„једињења која доприносе одлагању, превенцији и уклањању оксидативног оштећења молекула“*.²³¹ Иако су структурно хетерогена једињења, антиоксиданте је могуће класификовати на основу механизма по којем испољавају своје деловање.²⁴²

- ☞ Хелатизација металних јона који подлежу (бакар, гвожђе и манган) или не учествују (цинк и кадмијум) у оксидоредукционим реакцијама;
- ☞ Инхибиција NADH оксидазе и ксантин оксидазе, као кључних фактора у ендогеној продукцији слободних радикала;
- ☞ Активација прве линије одбране, тј. ендогених антиоксидативних ензима (супероксид дисмутаза и каталаза);
- ☞ Спречавање оксидације двоструке везе незасићених масних киселина (пероксидација);
- ☞ Превенција одвијања двоструке овојнице ДНК и хромозомских аберација;
- ☞ Секвестрација слободних радикала и њихова неутрализација;
- ☞ Спречавање модификација протеина и разарања угљених хидрата и настајање карбонилних једињења са потенцијалним мутагеним особинама.

Узимајући у обзир модалитет деловања антиоксиданата, тј. да ли антиоксиданти реагују превентивно или своју активност испољавају путем „хватања“ слободних радикала и обнове оштећења, могуће их је класификовати и као антиоксиданте прве, друге, треће и четврте линије одбране.²⁴³

☞ *Антиоксиданти прве линије одбране* - ензимски и неензимски антиоксиданти који онемогућавају формирање слободних радикала у ћелији неутралишући молекуле и радикале који би потенцијално могли да генеришу ROS. Типични ензимски представници су супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза, док су екстра- и интрацелуларни протеини - феритин, церулоплазмин, трансферин, лактоферин и албумин неензимске природе;

☞ *Антиоксиданти друге линије одбране* - неензимски антиоксиданти који инхибирају иницијацију слободно-радикалских ланчаних реакција и онемогућавају фазу пропагације „хватајући“ и неутралишући слободне радикале и превodeћи их у неутралне облике који су мање штетни за ћелију. Своје антиоксидативно деловање на овај начин испољавају витамини.

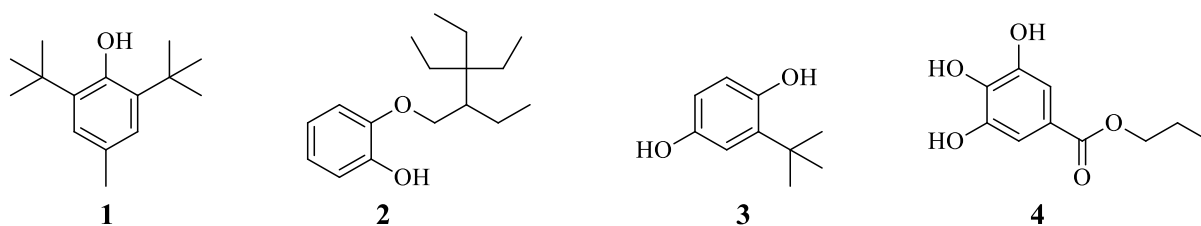
☞ *Антиоксиданти треће линије одбране* - ензимски репаративни антиоксиданти (гликозилазе, полимеразе, нуклеазе, протеазе и пептидазе) смештени у цитоплазми и митохондријама који се синтетишу *de novo* и смањују оштећења на биомолекулима - ДНК, протеинима и липидима и/или уклањају оштећене из ћелије;

☞ *Антиоксиданти четврте линије одбране* - антиоксиданти који делују такозваним адаптационим механизмом, тј. синтетишу се у право време и преносе у потребним концентрацијама до одређеног, циљног места, где спречавају синтезу слободних радикала.

Као што је већ истакнуто, једињења са антиоксидативним деловањем су структурно веома различита, те се класификација врши према другим параметрима. Поред споменуте поделе према ензимској, односно неензимској природи и типу деловања, антиоксиданте је могуће класификовати и према пореклу (природни и синтетски), поларности (поларни и неполарни) и месту настанка (ендогени и екзогени).²⁴⁴ Ендогени антиоксиданти обухватају комплексни систем који постоји у организму и доприноси одржању редокс хомеостазе, а обухвата ензиме и неензимске чиниоце и једињења мале молекулске масе, попут α -липоичне киселине, мокраћне киселине и коензима Q. Са друге стране, екзогени антиоксиданти подразумевају једињења која испољавају антиоксидативно деловање, али се уносе путем хране или у виду дијететских суплемената. Клиничким студијама је верификована хипотеза да исхрана која укључује поврће, интегралне житарице и намирнице богате ω -3 масним киселинама делује протективно на организам спречавајући настајање обољења, која врло често у својој основи имају оксидативни стрес.²⁴⁵ Главне групе екзогених антиоксиданата обухватају витамине (првенствено аскорбинска киселина и витамин E), каротеноиде и полифенолна једињења (флавоноиди, стилбени, фенолне киселине, итд.).²⁴⁶ Ипак, литература прописује и ограничења њиховог дневног уноса, како би се предупредио прооксидативни ефекат високих доза антиоксиданата и нуспојава у виду повећања антиоксидативног стреса.²⁴⁷

Данас су у комерцијалној употреби веома заступљени антиоксиданти синтетског порекла, као што су бутил хидрокситолуен (БХТ), *t*-бутил-хидрохинон (ТВНQ), бутил

хидроксианизол (БХА) и пропил-галат (ПГ) (Слика 12). Иако су веома ефикасни у ниским дозама у којима се примењују (као конзерванси у прехранбеној и козметичкој индустрији), новије студије показују да синтетски антиоксиданти могу имати негативне последице на људски организам, пре свега на нивоу гастроинтестиналног тракта и индукције карциногенезе, па је стога Европска агенција за безбедност хране (*European Food Safety Authority*) прописала њихов максимални дневни унос и потребу да се њихова конзумација драстично смањи.²⁴⁸ Због тога је фокус савремених истраживања на новим изворима природних антиоксиданата задовољавајуће ефикасности, али редукованих споредних нежељених ефеката.



Слика 12. Структуре најпознатијих синтетичких антиоксиданата: **1** - бутил-хидрокситолуен (БХТ), **2** - бутил-хидроксианизол (БХА), **3** - *t*-бутил-хидрохинон (ТВНҚ) и **4** - пропил галат (ПГ).

2.6.2.2. Лековите биљке као извори природних антиоксиданата

Лековите биљке су одавно препознате у традиционалној медицини као једни од најбитнијих фактора превенције различитих обољења. Поред смањења оксидативних оштећења, биљке могу деловати и као презервативи у прехранбеној, козметичкој и фармацеутској индустрији, чиме се акценат ставља првенствено на њихово антиоксидативно деловање.^{249–251} Скорашње студије су показале да иако биљке поседују низ структурно различитих антиоксидативних једињења, њихов антиоксидативни потенцијал је у директној корелацији са количином фенолних једињења, те се стога може сматрати да су управо полифеноли одговорни за посматрање лековитих биљака као потенцијалног ресурса природних антиоксиданата.^{252,253} У прилог наведеној тврдњи, треба додати и чињеницу да је екстракт рузмарина (*Rosmarinus officinalis*) уврштен на Европску листу додатака храни под ознаком Е392 као безбедан и ефикасан антиоксидант, због високог садржаја полифенолних компонената која спречавају оксидативне промене у намирницама.²⁵⁴

Фенолна једињења, производи секундарног метаболизма у биљкама, представљају једну од најатрактивнијих и највише испитиваних група једињења са антиоксидативним деловањем. Захваљујући својој структури могу да донирају атом

водоника или електрон слободном радикалу неутралишући га, док се сама преводи у стабилан, али мање реактиван радикалски облик. Стабилност радикалске форме условљена је постојањем резонантних облика, што је представљено на Схеми 6.

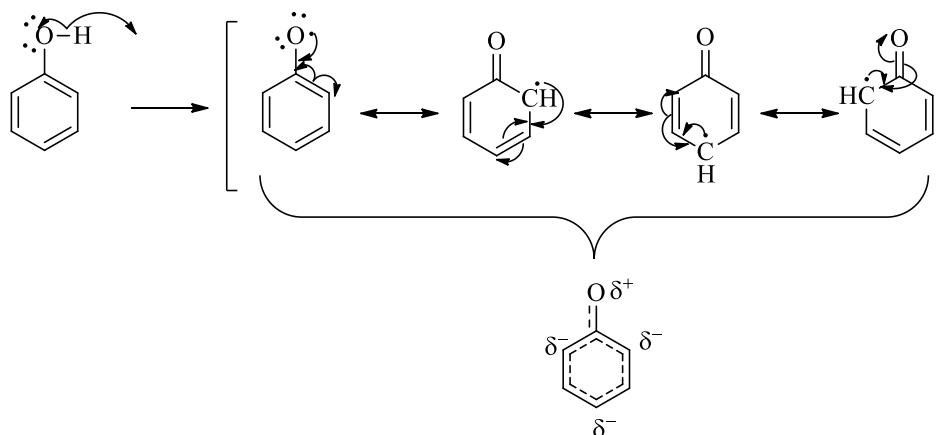


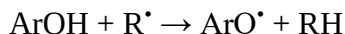
Схема 6. Резонантне форме фенокси радикала.²⁵⁵

Студије су показале да је за антиоксидативни капацитет флавоноида одговорно неколико фактора. Присуство две хидроксилне групе у Б прстену флавоноида значајно доприноси њиховој антирадикалској активности, будући да поменуте групе поседују изражена електрон-донирајућа својства, утичу на делокализацију електрона, чиме повећавају стабилност радикалске форме флавоноида. Делокализација електрона условљена је и присуством двоструке везе између C2 и C3 са кето групом у положају C4 Ц прстена. Ипак, присуство C2-C3 двоструке везе није од пресудног значаја за антирадикалски капацитет флавоноида, што је евидентно на примеру флаванола, који су међу најјачим антиоксидантима, а у чијој структури је C2-C3 веза засићена. Од важности је слободна хидроксилна група у положају 3, јер је показано да везивање шећерне компоненте доводи до смањења активности флавоноида. Поред тога, установљено је да максималан антирадикалски капацитет остварују једињења која поседују хидроксилне групе у положају 3 прстена Ц и 5 (прстен А), заједно са кето групом у положају 4.²⁵⁶⁻²⁵⁸

Када је реч о фенолним киселинама, примећено је да хидроксициметне киселине испољавају снажнији антирадикалски капацитет у поређењу са дериватима хидроксibenзоєе киселине, због израженије резонантне стабилизације услед присуства арилокси групе.²⁵⁹ До сада је објашњено неколико механизма којима се описује антиоксидативна активност фенолних једињења:²⁶⁰⁻²⁶²

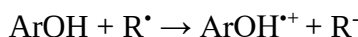
•НАТ механизам (енг. *Hydrogen atom transfer*), који укључује пренос водоника са фенола на слободни радикал хомолитичким раскидањем О-Н везе, чиме се фенол

преводи у радикалску, резонантно стабилизовану форму, а слободни радикал неутралише;

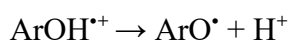
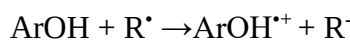


Посебан тип НАТ механизма представља PCET механизам (енг. *Proton-coupled electron transfer*), који подразумева пренос протона и електрона донираног водоника укључујући неколико молекулских орбитала, док се у НАТ типу реакције трансфер одиграва у оквиру исте орбитале.

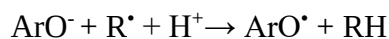
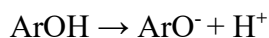
⚡SET (енг. *Single electron transfer*); базира се на електронском трансферу, са фенола на радикал, генеришући притом енергетски стабилан радикал са парним бројем електрона и ароматични радикал мање реактивности;



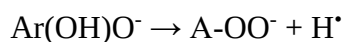
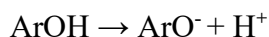
⚡SET-PT (енг. *Sequential electron proton transfer*); одвија се у два корака: а) Фенол реагује са слободним радикалом предајући му електрон, генеришући катјонски облик фенола, док се радикал преводи у ањонску форму, да би се потом у следећем ступњу б) катјонски облик депротоновао дајући фенолни радикал и протон;



⚡SPL-ET (енг. *Sequential proton loss electron transfer*) се такође одиграва у две фазе. Прва подразумева хетеролитичко раскидање О-Н групе, депротоновање фенолног једињења и добијање ањонског облика уз ослобађања протона, који потом у другом ступњу реагује са слободним радикалом, а ањон губи електрон;

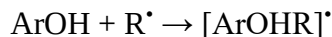


⚡SPL-HAT (енг. *Sequential proton loss hydrogen atom transfer*), чији је први корак идентичан претходном механизму, али у наредном кораку ањонски облик не губи електрон, већ водоник;

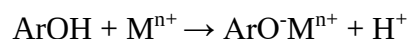


⚡RAF (енг. *Radical aduct formation*), супротно претходно поменутиим механизмима, фенол не донира протон нити електрон радикалу, већ са њим гради радикалски адукт.

Одигравање ове реакције детерминисано је пре свега доступношћу реакционог центра антиоксиданта и величине слободног радикала и присуством стерних сметњи;



☞ТМС (енг. *Transition metal chelation*), подразумева хелирање тешких метала од стране анјона антиоксиданата, које се одиграва захваљујући депротонованој хидроксилној групи фенола, која поседује високу густину наелектрисања и тиме представља одговарајући лиганд за катјоне прелазних метала.



Поред предложених конвенционалних механизма који се базирају на смањењу слободних радикала, комплексност реакција које се одигравају унутар организма указује на могућност да полифенолна једињења испољавају антиоксидативну активност и путем интеракција са секундарним ћелијским гласницима, путем експресије гена или модулацијом ензимских активности које активирају интрацелуларни одговор на оксидативни стрес.²⁶³ Ипак, ограничен број до сада спроведених *in vivo* студија оставља питања детаљних унутарћелијских механизма и даље отвореним и актуелним.

2.7. Оксидативни стрес у ткивима

2.7.1. Морфофункционалне карактеристике јетре, бубрега и тестиса

Оксидативна оштећења органа представљају један од основних фактора развоја обољења и дисфункције органа. У циљу бољег разумевања патогенезе и патофизиологије оксидативног стреса на нивоу појединих органа, у наставку је дат преглед морфофункционалних карактеристика јетре, бубрега и тестиса.

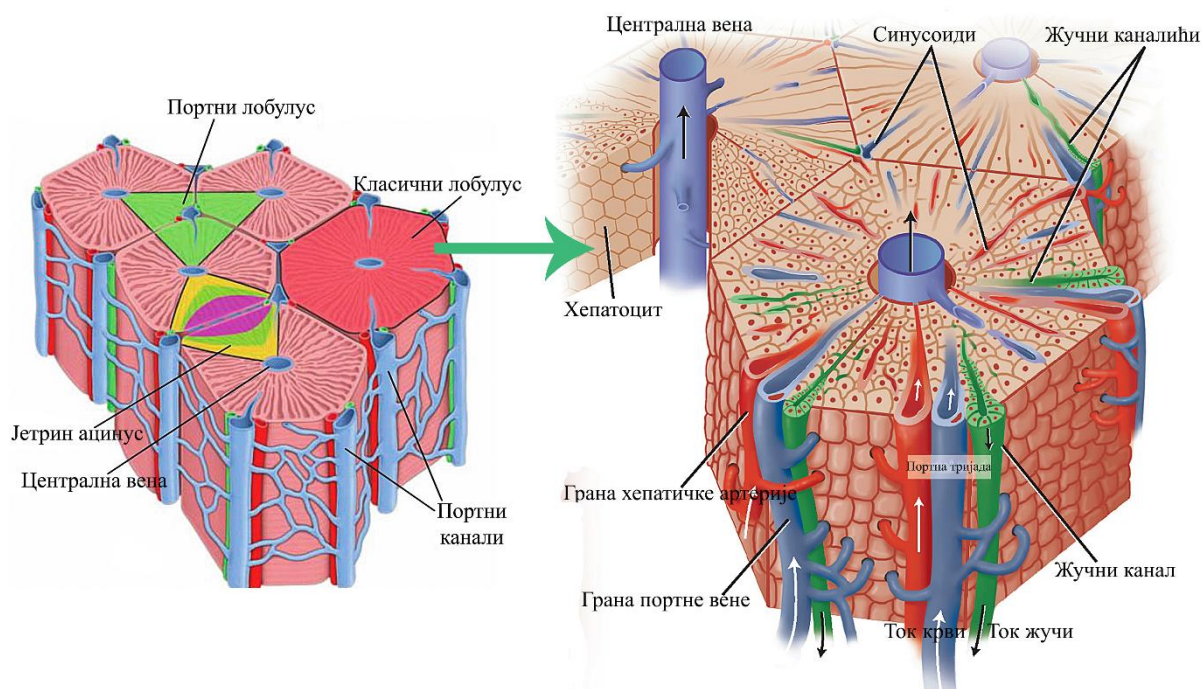
Јетра

Јетра (лат. *hepar*) је један од органа који се први развијају током феталног периода и после коже представља највећи орган у људском телу. Њена улога у организму је веома комплекса и обухвата многобројне функције, те се стога често означава и као централна лабораторија организма. Основна анатомска јединица јетре је хексагонални режњих (*lobulus*; Слика 13) изграђен од мреже ћелија јетре (хепатоцита) зракасто распоређених у виду плоча (Ремаркове гредице) око терминалне (централне) вене и билијарних капилара и лимфних и крвних судова на периферији (портни простори).²⁶⁴ Портни (Киернанови)

простори су места чије су ивице три суседна лобулуса и у којима су смештене портне тријаде, које су грађене од венуле и артериоле (огранака портне вене и хепатичне артерије) и 2-3 интерлобуларна жучна каналића. Хепатоцити су најбројнија популација ћелија јетре. Углавном су једноједарни, а у њиховој цитоплазми смештени су глатки и гранулисани ендоплазматски ретикулум (базофилна телашца), велики број митохондрија, лизозоми, пероксизоми и бројни Голџијеви комплекси. Између плоча које граде хепатоцити распоређени су синусоиди јетре, капиларни судови неправилног типа изграђени од дисконтинуираних ендотелних ћелија. Синусиодни капилари конвергирају према централном делу лобулуса, где се уливају у централну вену. Хепатоците од синусоида дели Дисеов (*Disse*) простор, омогућавајући несметани проток молекула који могу бити апсорбовани од стране хепатоцита путем активног транспорта или дифузије. У Дисеовом простору се ствара лимфа и у њему се налазе специјализоване Ито ћелије (енг. *Ito* или *hepatic stellate cells*, HSC), које садрже масне капљице богате витамином А, чија је улога у хомеостазу ретиноида и секрецији хормона раста и протеогликана. Унутар синусоида смештене су Купферове (енг. *Browicz-Kupffer cells*) ћелије, макрофаги који су део мононуклеарног фагоцитног система који учествује у уклањању молекула, патогена и апоптотичких и некротичких хепатоцита.^{264,265} У синусоидима су поред ендотелних, Ито и Купферових ћелија, смештене и Пит ћелије (енг. *Pit cells*), специфичне за јетру и припадају групи лимфоцитних ћелија названих ћелије убице (енг. *Natural killer cells*, NK cells).²⁶⁶

Са друге стране, посматрајући микроциркулацију јетре, развијен је тзв. Рапапортов ацинусни модел, по ком се за основну функционалну јединицу јетре сматра ацинус, ткиво јетре ромбоидног облика оивичено централним венама два суседна лобулуса и два блиска портна простора. Поред наведена два модела, у литератури се среће и трећи модел којим се објашњава структурна и функционална организација јетре – портни лобулус, који подразумева организацију жучних каналића којима се жуч излучује у дванаестопалачно црево.

Портни лобулус је троугластог облика оивичен централним венама три суседна режњића и у чијем су средишту портни простори са билијарним каналићима из којих се жуч излива у један жучни канал.



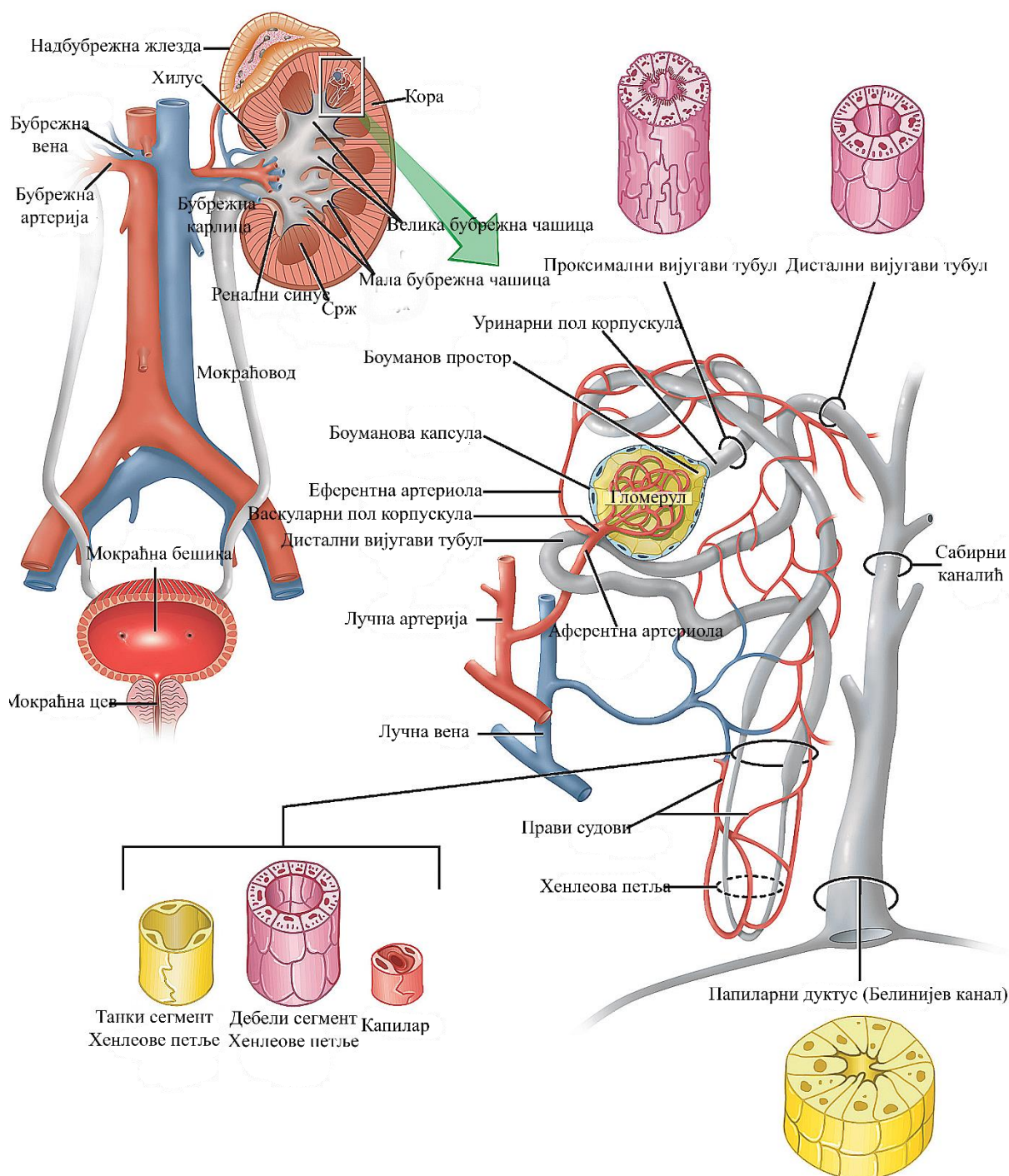
Слика 13. Анатомска и функционална организација јетре са издвојеним приказом класичног лобулуса јетре (преузето уз модификације^{267,268}).

Јетра учествује у виталним функцијама у организму. У хепатоцитима се, из холестерола, синтетишу жучне киселине, које су основни састојци жучи, неопходне за одигравање метаболизма липида. У јетри се врши разградња хемоглобина, приликом којег настају жучне боје билирубин и биливердин. Реакције биотрансформације ксенобиотика, а уједно и филтрације и детоксикације крви се одигравају управо у јетри. Поред наведеног, јетра заузима кључну улогу у процесима метаболизма угљених хидрата (депоновање и разградња гликогена и моносахарида), протеина (деаминација аминокиселина, синтеза протеина крвне плазме) и масти (β -оксидација масних киселина, синтеза холестерола, фосфолипида и липопротеина).²⁶⁹

Бубрези

Бубрези (лат. *ren*, *nefros*, Слика 14) су парни органи који заједно са мокраћном бешиком, уринарним путевима и уретром чине уринарни систем. Смештени су бочно од кичменог стуба у ретроперитонеумском простору. Чврсте су конзистенције, глатке спољашње површине, пасуљастог облика и црвенкасто-смеђе боје, а дужина им је обично између 10 и 12 cm код човека, док је ширина у просеку 5 cm. Предња страна бубрега (лат. *facies anterior*) је оријентисана ка споља и конвексна, док је задња страна (лат. *facies posterior*) окренута ка назад и мање је испупчена у односу на предњу. У морфологији бубрега

разликују се паренхим и строма бубрега. Паренхим бубрега чине спољашњи светлији део назван ренални кортекс (кора) и медуларни (срж) сегмент тамније боје. Кора (лат. *cortex renalis*) је гранулирана и састоји се од кортикалног лавиринта (лат. *labyrinthus corticis*), паралелних каналића - медуларних зрака (лат. *radii medullares*) и кортикалног међупростора названог Бертинијеви стубови (лат. *columnae renales Bertini*).



Слика 14. Попречни пресек бубрега, са издвојеним приказом крвних судова и каналића нефрона (адаптирано²⁶⁸).

Медуларни зраци, другачије названи Ферајнове пирамиде, полазе из сржи бубрега, тачније из база 10-18 конусних ткивних маса које се називају медуларне или Малпигијеве пирамиде (лат. *pyramides renales*). Срж се завршава испупчењима усмереним ка бубрежној карлици, која представља централну шупљину бубрега и која има улогу сакупљања коначног урина, који се потом путем мокраћних канала (по један из сваког бубрега) транспортује до мокраћне бешике. Строма бубрега је изграђена од интерстицијумског ткива и фиброзне капсуле, танке еластичне опне која обавија спољашњу површину бубрега. Сваки бубрег је, поред фиброзне капсуле, обавијен и масном капсулом (бубрежним лојем), чија је улога да онемогући померање бубрега приликом наглих покрета, као и фасцијалним омотачем, везивним ткивом које обавија бубреге и надбубрежне жлезде.^{270,271}

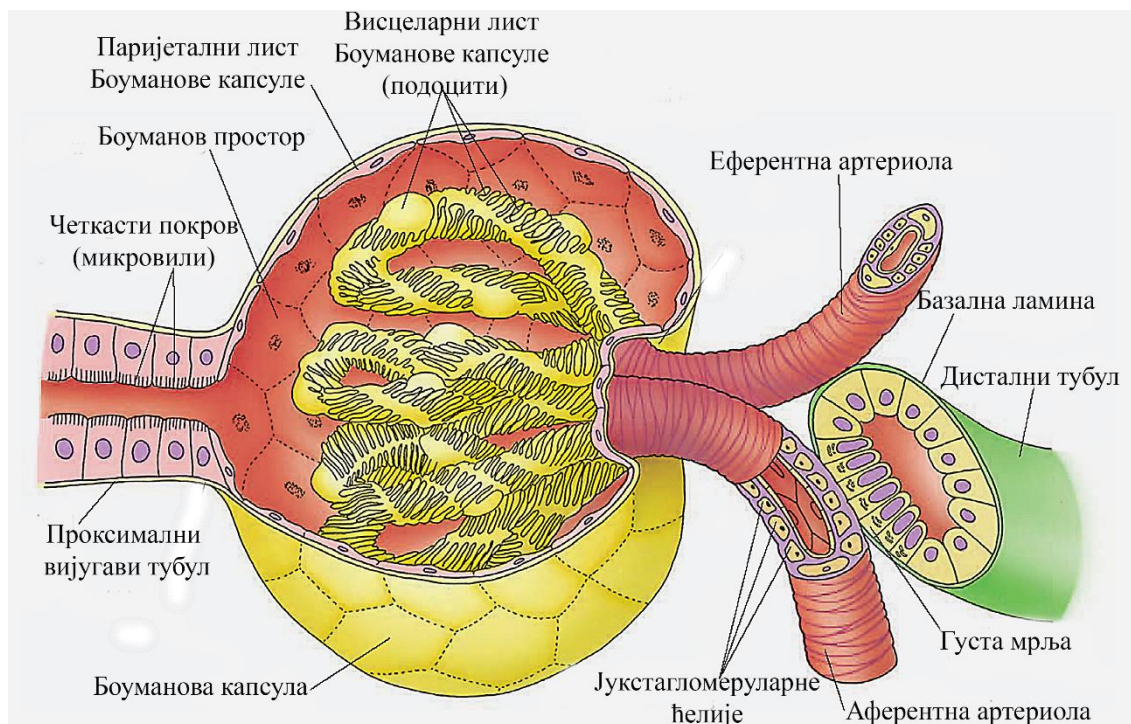
У бубрежном кортексу се налази од пар стотина хиљада до преко милион нефрона (грч. *nephros*, бубрег), основне морфофункционалне јединице бубрега. Управо број нефрона одређује величину бубрега код различитих организама.

Нефрон је изграђен од реналног тубула и Малпигијевог телашца (ренални корпускул; лат. *corpusculum renale*). Ренални корпускул је састављен од мреже крвних капилара-гломерула и двоструког епитела који их обавија, тзв. гломерулске Боуманове (енг. *Bowman*) капсуле (Слика 15). Гломерул представља сплет крвних капилара насталих гранањем артерије која доводи крв у гломерул (аферентна артериола).

Настала артериола се потом у тубулском делу нефрона поново грана на капиларе из којих се крв улива у интерлобуларне вене. У грађи двоструког епитела Боуманове капсуле учествују два типа ћелија: а) *пљоснате ћелије*, лоциране споља (паријетални лист) и налегле на базалну ламину и б) *ћелије комплексније морфологије*, које се називају подоцити (висцеларни лист), које су приљубљене уз зидове реналних капилара дуж којих, захваљујући поседовању псеудопода (које се преплићу међусобно), образују филтрационе отворе, тзв. фенестре. Између ових ћелија смештен је интеркапсуларни (Боуманов) простор. Улога реналног корпускула се огледа у ултрафилтрацији крвне плазме, која доводи до формирања и сакупљања примарног урина (интеркапсуларни простор).

Са друге стране, бубрежни тубул чине три целине: а) *проксимални тубул*, изграђен од нефроцита, чије микроресице на луменској страни формирају четкасти покров, који повећава површину ресорпције материја из гломерулског филтрата и у чијем се базолатералном сегменту налази Na^+/K^+ -АТПаза; б) *Хенлеова петља*, која представља наставак проксималног тубула, има карактеристичан изглед слова U, пролази кроз

медулу и поново се враћа у кортекс, где се преко густе мрље (лат. *macula densa*) спаја са в) дисталним тубулом, чије ћелије учествују у активном транспорту јона.^{270,271}



Слика 15. Ренални корпускул (модификовано²⁷²).

Конвергенцијом дисталних тубула из неколико нефрона формира се сабирни каналић, који је усмерен ка бубрежној карлици где неколико каналића гради Белинијев канал (папиларни дуктус). Већи број дуктуса формира решетасто поље на површини бубрежне папиле, које је карактеристично по трансформацији једнослојног цилиндричног епитела у епител прелазног типа, типичан за све нисходне мокраћне канале изузев дисталног дела мокраћне цеви.^{271,273–276}

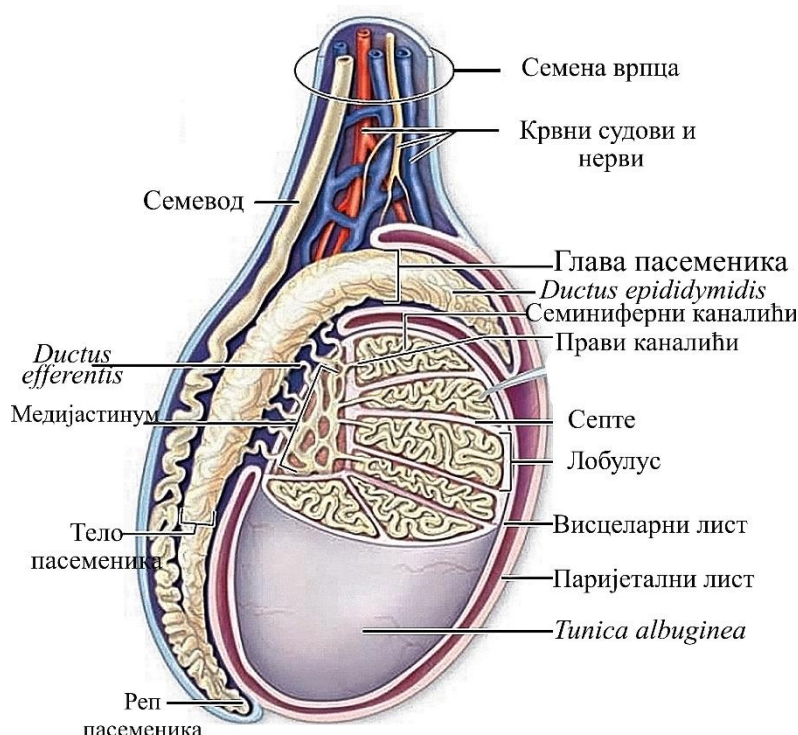
Примарна улога бубрега огледа се у екскрецији вишка воде из организма, као и крајњих продуката метаболизма који су штетни или непотребни организму. Бубрези учествују и у одржавању ацидо-базне равнотеже организма, осмотске концентрације и хомеостазе телесних течности и регулацији нивоа калцијума, фосфора и калијума. Поред тога, бубрези обављају и ендокрину функцију. У њима се синтетише и секретује еритропоетин код одраслих особа, хормон гликопротеинске природе чија је улога у стимулацији еритропоезе у коштаној сржи. Протеолитички ензим ренин се секретује у бубрезима и ослобађа у крв услед пада крвног притиска и концентрације натријума у крви, где реагује са супстратом (ангиотензиногеном) и по принципу ренин-ангиотензин негативне повратне спреге делује вазоконструкторно, регулишући волумен крви и крвни

притисак. Сличну улогу обављају и glandуларни бубрежни каликреини, пептиди које лучи кортекс бубрега и који у крви реагују са кининогеном, формирајући брадикинин, познати вазодилататор крвних судова. Улога бубрега у хомеостазу калцијума, фосфата и магнезијума повезана је са синтезом стероидног хормона 1,25-дихидроксихолекалциферола, који у бубрезима настаје модификацијом витамина Д. Наиме, овај хормон индукује синтезу транспортних протеина за калцијум, чиме подстиче његову ресорпцију из дигестивног тракта и реапсорпцију у тубулима.²⁷⁷

Тестиси

Мушки репродуктивни систем чине семеници (тестиси), систем изводних канала (по један из сваког тестиса), помоћне егзокрине жлезде и копулациони орган. Семеници (лат. *testis*) су парне мушке полне жлезде (Слика 16), које имају изглед спљоштеног јајета и просечне су дужине око 4-5 cm. Предња ивица тестиса је конвексна, док је задња права и прекривена пасемеником са спољне стране, а са унутрашње се налази улаз у семеник, кроз који пролазе крвни судови и нерви тестиса. У морфологији тестиса разликују се две целине – паренхим и строма. Строму семеника чине: а) *капсула семеника* (лат. *tunica albuginea*) дебели слој везивног ткива који формира фиброзу опну која обавија оба тестиса и испод које се налази б) *васкуларни слој* (лат. *tunica vasculosa*), који садржи крвне судове; затим в) *Хајморово тело* (лат. *mediastinum testis*), које настаје задебљањем капсуле у задњем делу тестиса и чији део конвергира ка тестису као г) *везивне преграде* (лат. *septulae testis*), које деле семенике на режњиће (лат. *lobuli testis*). Паренхим је лоциран у режњићима тестиса и изграђен је од семиниферних каналића дуж чијих зидова је лоциран герминативни епител који садржи герминативне ћелије које учествују у сперматогенези (продукцији мушких гамета; егзокрина улога тестиса) и потпорне Сертолијеве (*Sertoli*) ћелије. Сваки семиниферни каналић је обавијен фибробластима који му омогућавају тубуларне покрете, док је простор између тубула означен као интерстицијумско ткиво и у њему су смештене интерстицијумске Лејдигове (*Leydig*) ћелије, које секретују тестостерон (ендокрина улога тестиса).²⁷⁸ У герминативном епителу су смештене герминативне ћелије (сперматогоније) које производе сперматозоиде процесом сперматогенезе. Разликују се два типа сперматогонија, А и Б, при чему једино сперматогоније типа Б учествују у сперматогенези. Она подразумева митотичку деобу диплоидне сперматогоније, при чему настају једна сперматогонија и једна примарна сперматоцита, од које у првој мејотичкој деоби настају две секундарне

сперматоците, а потом другом мејозом настају четири хаплоидне сперматиде, које сазревањем прелазе у сперматозоиде.²⁷¹



Слика 16. Грађа тестиса (модификовано²⁷⁵).

Улога Сертолијевих ћелија је вишеструка. Поред поменуте потпорне улоге, оне секретују и андроген-везујући протеин (енг. *Androgen binding protein*, АБП) (транспортује тестостерон у лумен семиниферних каналића), тестикуларни медијум богат фруктозом (омогућава кретање сперматозоида кроз генитални тракт), хормон инхибин (инхибира секрецију фоликулостимулирајућег хормона аденохипофизе и тиме спречава прекомерну секрецију тестостерона), тестикуларни трансферин (обезбеђује гвожђе неопходно зрелим полним ћелијама) и анти-Милеров хормон (спречава формирање женских репродуктивних органа током ембрионалног развоја мушкараца).²⁷² Суседне Сертолијеве ћелије у непосредној околини базалне ламине семиниферних каналића су тесно повезане формирајући крвно-тестикуларну баријеру, чија је примарна улога заштита герминативних ћелија од штетних агенаса из крви (превенцији стварања антитела и аутоимуног одговора).²⁶⁸

Интерстицијалне Лејдигове ћелије учествују у биосинтези и секрецији андрогених полних хормона, од којих су физиолошки најзначајнији тестостерон и дихидротестостерон. Њихова улога је пре свега андрогена – учествују у развоју полних карактеристика, одржавању сперматогенезе и секреторној активности полних жлезда.

Анаболички ефекти тестостерона огледају се у стимулацији синтезе протеина, процеса окоштавања и еритропоезе. Осим у тестисима, мале количине андрогена се секретују и у надбубрежним жлездама и у јајницима жена.

Тестостерон (17β -хидрокси-4-андростен-3-он) се у организму синтетише сложеним ензимским реакцијама из холестерола (Схема 7). Холестерол се налази у цитоплазми у естерификованом облику. Каскадном реакцијом путем сАМР уз утрошак енергије и активност холестерол естеразе одвија се процес настајања слободног холестерола.

Слободни холестерол потом мигрира до митохондрија где се одвија прва реакција у процесу биосинтезе тестостерона, која подразумева отцепљење бочног ланца холестерола (изокапроалдехид) катализовано P450_{sc} ензимом дајући прегненолон. Он се ослобађа у цитоплазму и допрема до мембране глатког ендоплазматичног ретикулума, где се врши хидроксилација на положају C17, након чега се цепа бочни ланац између C-20 и C21 и настаје дехидроепиандростерон. Обе реакције катализоване су ензимом CYP17, 17α -хидроксилаза-17,20-лиаза. Хидроксилна група насталог C17-кетона подлеже оксидацији, праћеној таутомеризацијом двоструке везе у А/Б стеридним прстеновима дајући андростендиол, који редукцијом кето групе у положају C17 и изомеризацијом даје мушки полни хормон тестостерон. Овај пут синтезе тестостерона, тзв. $\Delta 5$ (5-ен- 3β -хидрокси) пут синтезе, карактеристичан је за човека. Са друге стране, код других организама, попут пацова, тестостерон се синтетише $\Delta 4$ путем (4-ен-3-оксо пут), у којем се прегненолон преводи у прогестерон, који ензимским реакцијама преко 17α -хидроксипрогестерона и андростендиона даје тестостерон.^{279,280}

Секреција тестостерона је регулисана хипоталамо-хипофизно-тестикуларном осовином. Лучење гонадотропин-ослобађајућег хормона (енг. *Gonadotropin releasing hormone*, GnRH) у хипоталамусу стимулише лучење хормона предњег режња хипофизе - фоликулостимулирајућег хормона (FSH), који утиче на развој семиниферних каналића, и лутеинизирајућег хормона (LH), који везујући се за специфичне Г-протеинске рецепторе у мембрани Лејдигових ћелија иницира каскадну реакцију која резултује синтезом прекурсора тестостерона, прегненолона. На овај начин се омогућава нормална сперматогенеза. Део тестостерона, пак, доспева у системску циркулацију и бива допремљен до свих ћелија. Повећање концентрације тестостерона у циркулацији делује на хипоталамус и хипофизу механизмом негативне повратне спреге, чиме се спречава његова даља продукција.²⁸¹

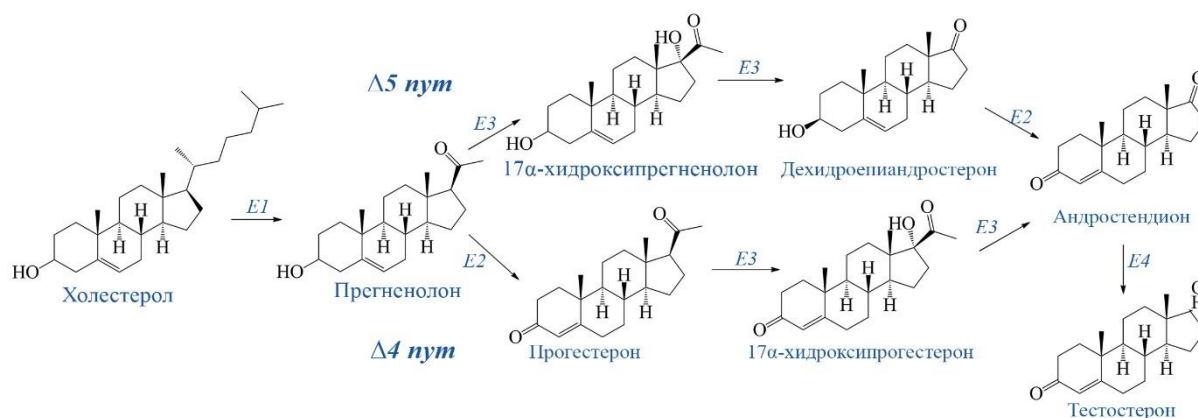
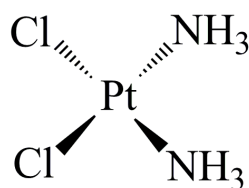


Схема 7. Δ^4 и Δ^5 пут биосинтезе тестостерона. Ензими: E1 - холестерол дезмолаза; E2 - 3β -хидроксистероид дехидрогеназа; E3 - 17α -хидроксилаза; E4 - 17β -хидроксистероид дехидрогеназа

2.7.2. Оксидативни стрес у ткивима изазван хемиотерапеутицима

Метали представљају једне од основних структурних и функционалних компонената ћелија, који се најчешће налазе као активни центри ензима и укључени су у биолошке процесе, те стога сваки дисбаланс између реалних потреба ћелије и биодоступности метала утиче на физиолошке процесе у организму.²⁸² Посебну пажњу научника привлаче прелазни метали, због широког дијапазона термодинамичких и кинетичких карактеристика, координативних и редокс особина, као и реакција са органским супстратима. Стога не изненађује податак да су метали све присутнији у медицинским истраживањима као потенцијални антитуморски агенси.^{283,284} Један од првих откривених антитуморских агенаса је цисплатина (*cis*-диаминдихлороплатина (II); *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂]; Слика 17). Иако је први пут синтетисана средином XIX века, тек је шездесетих година XX века откривена потенцијална антипролиферативна активност цисплатине. Наиме, научник Росенберг (Rosenberg) је, базирајући се на резултатима експеримента у којем је открио да цисплатина утиче на инхибицију деобе ћелија *Escherichia coli*, претпоставио да се она може користити и за спречавање неконтролисане пролиферације ћелија карактеристичне за туморске ћелије.



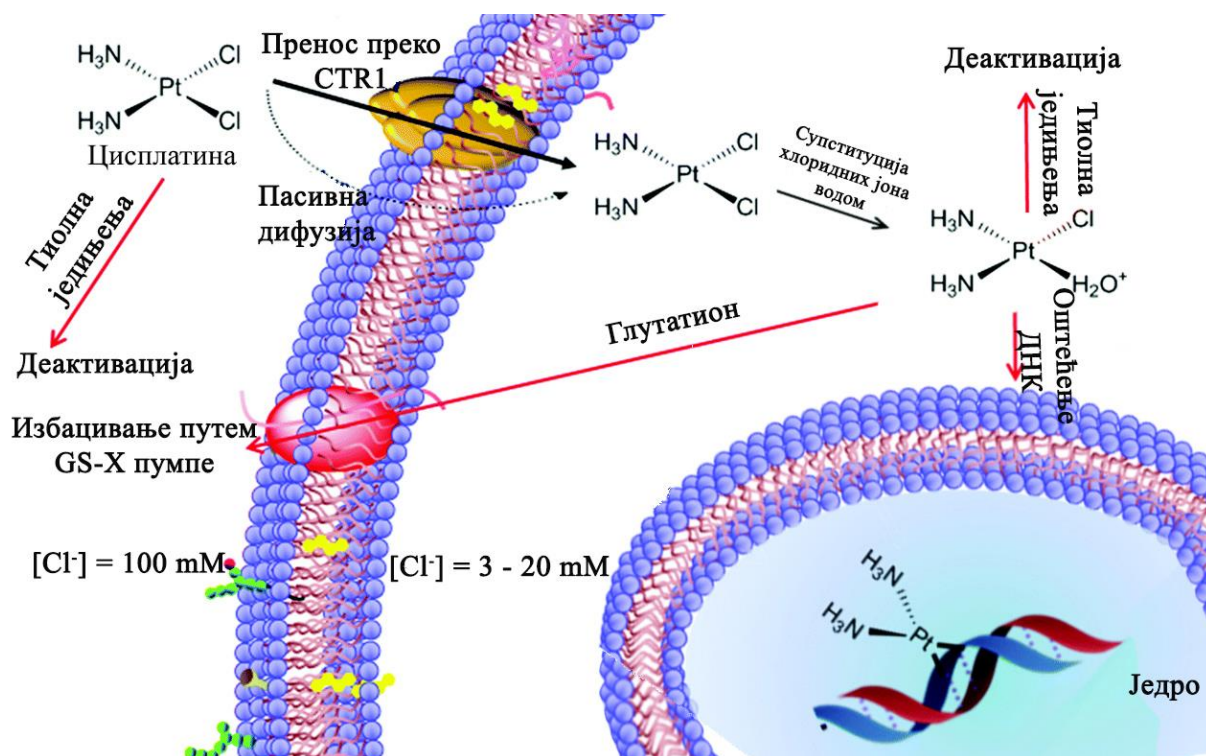
Слика 17. Структура цисплатине.

Интензивна медицинска и хемијска испитивања, као и одобрење за употребу у терапији оболелих од канцера од стране Америчке агенције за храну и лекове, допринели су да цисплатина данас буде један од најпотентнијих и широко распрострањених хемиотерапеутика који се примењују у терапији тумора високе пролиферативне активности – тумора јајника, тестиса, плућа, дебелог црева и мокраћне бешике.²⁸⁵ Сматра се да се антитуморска активност цисплатине одвија у четири корака (Слика 18):

- 1) Доспевање у ћелију путем пасивне дифузије или протеинских носача;
- 2) Супституција хлоридних јона цисплатине водом (услед разлике у концентрацији хлоридних јона у цитоплазми и екстрацелуларном матриксу), дајући позитивно наелектрисане јоне платине $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$ и $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$;
- 3) Ковалентно везивање за ћелијске нуклеofile, протеине и пуринске базе гуанин и аденозин ДНК, примарно у N7 позицији и формирање 1,2-интраланчаних адуката;
- 4) Застој у G2 фази ћелијског циклуса, оштећење ДНК, инхибиција репликације и транскрипције ДНК и индукција унутрашњег и спољашњег пута апоптозе у канцер ћелијама.^{286,287}

Са друге стране, иако је цисплатина врло ефикасна у терапији тумора, евидентирано је да њена примена нарушава хомеостазу у здравим ткивима и да се на нивоу органа испољавају токсични ефекти који се манифестују нарушавањем њихове метаболичке функције и морфологије. Поред тога, временом се уочава да примењене дозе постају мање или потпуно неефикасне, односно долази до развоја тзв. стечене резистенције. С тим у вези, у даљој терапији се примењују више дозе хемиотерапеутика, што за последицу има токсичне ефекте и нуспојаве на нивоу органа, које представљају основни ограничавајући фактор у дугорочној примени цисплатине у терапеутске сврхе. Литературни подаци указују да се токсичност цисплатине да се испољава на нивоу гастроинтестиналног тракта, јетре, бубрега, репродуктивних органа и уха.²⁸⁸ Сматра се да је у основи свих токсичних деловања цисплатине нарушавање редокс биланса у ткивима и оксидативни стрес.

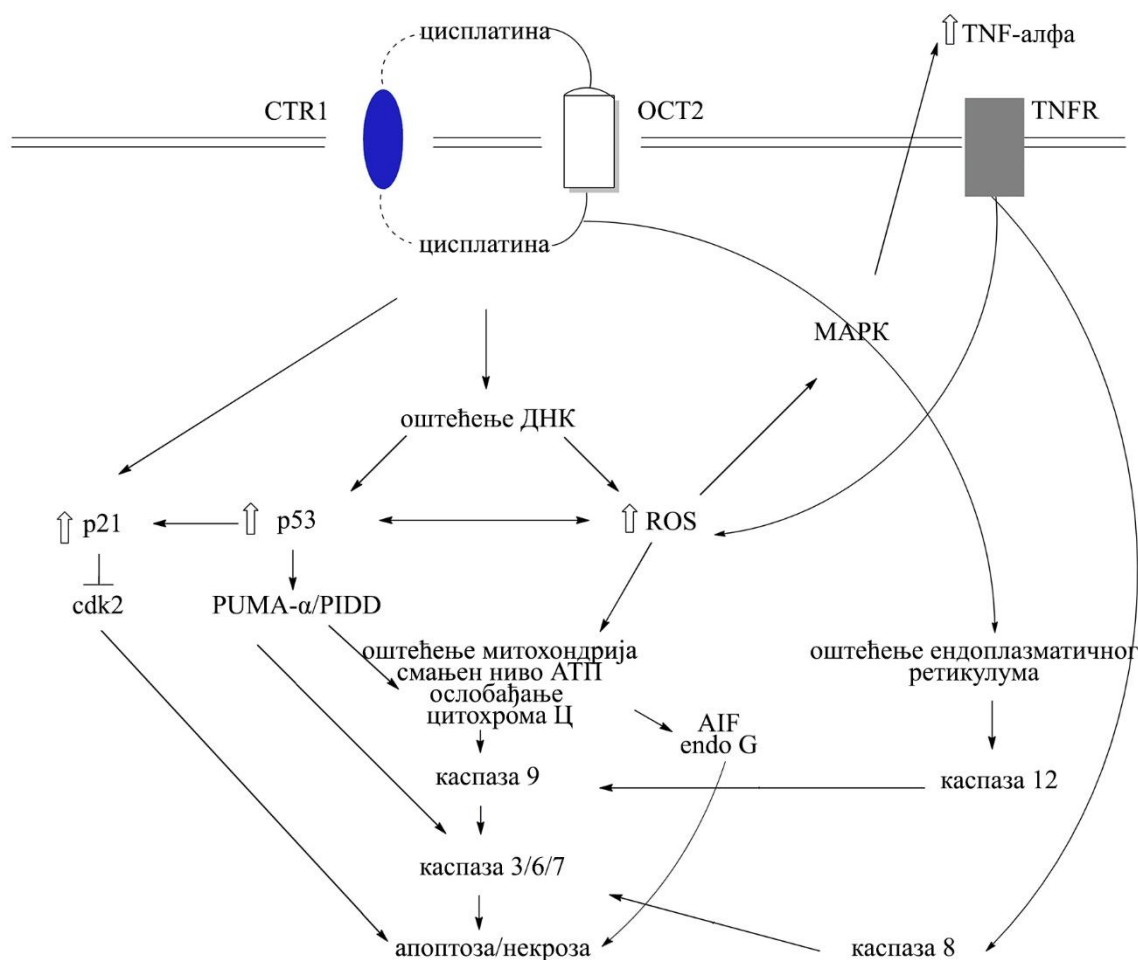
Прецизније, цисплатина индукује оксидативне промене или путем генерисања слободнорадикалских врста и/или оштећењем ензима за репарацију ДНК. Митохондријална ДНК је осетљивија на деловање цисплатине од једардне ДНК, услед веће акумулације цисплатине у митохондријама, као и мање ДНК-репарационих ензима у овим органелама, чиме се фаворизује синтеза неуобичајених протеина који постају део електрон-транспортног низа, чинећи митохондрије нефункционалним.



Слика 18. Графички приказ цитотоксичног деловања цисплатине (адаптирано²⁸⁹).

Такође, цисплатина индукује липидну пероксидацију, повећање слободних масних киселина у цревној слузокожи, као и активације NF- κ B сигналног пута и нагомилавања медијатора инфламаторних процеса у слузници (TNF- α).²⁹⁰

Комплексни механизми инфламације, апоптозе, фибриногенезе и оксидативног стреса укључени су у токсичност цисплатине на нивоу реналних ћелија (Слика 19). Примарно место испољавања токсичних ефеката цисплатине на здраве ћелије је у бубрезима.²⁹¹ Токсичност се највише уочава на реналним проксималним тубулима, што се објашњава чињеницом да ове ћелије садрже највећу густину митохондрија у поређењу са осталим бубрежним ћелијама. Конкретније, да ли ће нека ћелија акумулирати цисплатину и бити осетљива на њено токсично деловање детерминисано је волуменском густином митохондрија и потенцијалом на мембрани ових органела.²⁹² На нивоу тестиса, главна места на којима долази до оштећења нормалне функције тестиса су Лејдигове и Сертолијеве ћелије, као и ћелије герминативног епитела. Иако је прецизан механизам токсичности цисплатине на нивоу репродуктивних органа још увек недовољно истражен, сматра се да је нарушена редокс равнотежа у тестисима кључни фактор оксидативног оштећења.²⁹³



Слика 19. Механизам нефротоксичности цисплатине (адаптирано²⁹²).

Поред антиканцерогених лекова, укључујући и цисплатину, многобројни токсични агенси, попут остатака пестицида у храни, тешких метала, антиметаболита, често могу да буду узрочници поремећаја у биохемијским параметрима виталних органа - јетре, бубрега и система репродуктивних органа, чинећи их дисфункционалним.²⁹⁴⁻²⁹⁶ Хепатотоксичност је условљена физиолошком улогом јетре и њеним централним местом у метаболизму ксенобиотика, па је она стога и прва мета њиховог токсичног деловања. Метаболички статус јетре одређен је ензимском активношћу трансфераза и неензимских параметара, попут билирубина, те се стога ови маркери посматрају као параметри очуваности јетре. Са друге стране, путем бубрега се филтрира крв која може садржати токсичне материје, чије концентровање у бубрежним тубулама узрокује дегенеративне промене на нивоу органа. Поред клиничког прегледа урина, којим се процењују опште и физичко-хемијске особине урина, доступне су и анализе функционалних параметара бубрега у крвној плазми и серуму. Један од најчешће коришћених тестова је тзв. клиренс плазме (енг. *Clearance*), који је показатељ ефикасности којом бубрези из крвне плазме,

односно крви, елиминишу неке материје. Уреа, креатинин и мокраћна киселина се већим делом излучују путем урина, стога је очекивано да су њихове вредности у крви ниже код особа код којих бубрези имају нормалну функцију. Знатно повећање ових параметара у крви недвосмислено указује на оштећење и функционални поремећај бубрега, па су из тог разлога ово основни параметри који се узимају у обзир приликом процене стања бубрежних функција. Поједини лекови, попут седатива талидомида, повучни су са тржишта средином прошлог века, због доказаних нежељених ефекта на репродуктивни и нервни систем, са посебно израженим тератогеним деловањем.²⁹⁷ Друга једињења, пак, делују као ендокрини дисруптори, нарушавајући хормонску равнотежу.²⁹⁸

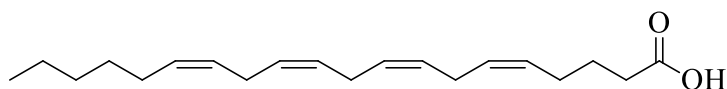
Како би се редуковала нежељена дејства лекова и хемиотерапеутика, укључујући и цисплатину, новија истраживања стављају у фокус примену природних производа или фитопрепарата, са циљем комбиноване апликације и лечења обољења. Екстракт мајорана (*Origanum majorana*), уље чурокота (*Nigella sativa*), као и фенолна једињења присутна у биљкама (кафеинска и ферулна киселина, нарингенин) наводе се у литератури као потенцијални протектори од токсичног деловања цисплатине на здраве ћелије.^{290,299,300} Ипак, препоручује се рационална употреба фитопрепарата, чији су бенефити научно верификовани, због чињенице да и саме биљне дроге могу бити узрочници токсичних ефеката у ткивима, те су за примену природних препарата у терапеутске сврхе токсиколошке студије од виталног значаја, како би се проценила безбедност и потенцијални бенефити природних препарата.^{301,302}

2.7.3. Оксидативни стрес и инфламаторни процеси

Запаљенски процеси (инфламација) представљају комплексан природни механизам имунолошког одговора организма на присуство патогена, који се одиграва у васкуларизованом везивном ткиву у патолошким стањима различитог карактера, попут изложености алергенима, микробних инфекција, хроничних обољења (неуродегенеративних, кардиоваскуларних и гастроинтестиналних), а које у основи подразумевају генерисање слободнорадикалских форми и настанак оксидативног стреса.³⁰³ Инфилтрација инфламаторних ћелија (неутрофила, моноцита и лимфоцита) ка месту запаљења представља главну карактеристику овог процеса. Том приликом, активирају се полиморфонуклеарни неутрофили, који ослобађају велики број ензима, медијатора инфламације и слободних радикала кисеоника и азота, при чему утичу на генерисање оксидативног стреса и оштећење ткива.^{304,305} Са друге стране, инфламаторни

процеси могу бити узроковани прекомерном количином слободних радикала. Конкретно, оксидативни стрес стимулише активацију протеинских комплекса, инфламазома, који утичу потом на сазревање проинфламаторних цитокина, интерлеукина 1- β , фактора некрозе тумора TNF- α и активацију проинфламаторне каспазе-1, стимулишући тако запаљење.³⁰⁶

Сматра се да поред цитокина, еикосаноиди представљају најзначајније медијаторе и модулаторе запаљених реакција.³⁰⁷ У основи, еикосаноиди су метаболити арахидонске киселине, ω -6 полинезасићене масне киселине са 20 угљеникових атома. Арахидонска киселина (Слика 20) је битан фактор интегритета и флуидности ћелијске мембране, будући да се у естерификованој форми налази у фосфолипидима ћелијске мембране. У синтези медијатора инфламације учествује слободна арахидонска киселина, која настаје хидролизом ацил групе са С-2 фосфолипида деловањем фосфолипазе А2. Настајање еикосаноида условљено је присуством четири двоструке везе у структури арахидонске киселине, чиме је она подложна ензимским реакцијама оксидације помоћу циклооксигеназа, липоксигеназа, као и цитохром Р450 и анандамидним путем.³⁰⁸ Слободнорадикалске форме кисеоника и азота пак узрокују неензимске модификације арахидонске киселине, образујући ендопероксиде и њихове редуковане облике, изопростане (изоформе простагландина).³⁰⁹



Слика 20. Структура арахидонске киселине.

2.7.3.1. Циклични пут метаболизма арахидонске киселине (циклооксигеназни)

Циклооксигеназе (COX) представљају фамилију ензима који катализују реакције трансформације еикосаноида до простагландина (примарно PGH₂, као и интермедијере PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α}) у васкуларном и гастроинтестиналном систему, простацилина у крвним судовима и тромбоксана (TXA₂, TXB₂) у крвним плочицама.³¹⁰ До сада су структурно окарактерисане три изоформе циклооксигеназа-COX-1, COX-2 и недавно откривена COX-3. COX-1 је пронађена у већини ткива, док је COX-2 у ткивима присутна у малим концентрацијама, пре свега у паренхималним ћелијама (изузев у срцу), и активира се као одговор на инфламаторни стимулус. COX-3 представља изоформу COX-1 са разликом у структури РНК (задржава 1 интрон), а пронађена је у мозгу паса и људи, аорти код човека и у ткивима глодара.^{311,312} Циклични метаболизам арахидонске киселине започиње циклооксигеназом, која испољава бифункционално деловање.

Наиме, у првој реакцији синтезе простагландина испољава се циклооксигеназно деловање ензима уграђивањем два молекула кисеоника у арахидонску киселину, чиме се образује циклопентанов прстен и формира простагландин G (PGG_2). Даље, COX делује као пероксидаза, превodeћи хидропероксидну групу PGG_2 у хидроксилну, чиме настаје PGH_2 . Ово једињење је кључни прекурсор свих производа циклооксигеназног пута. Даља судбина PGH_2 детерминисана је специфичним ензимима и ткивом у којем ће се одиграти модификације, па тако у крвним плочицама каталитичком активношћу тромбоксан синтазе настаје тромбоксан A_2 (агрегација тромбоцита, вазоконстриктор), док у ћелијама ендотела крвних судова настаје простагландин I_2 (PGI_2 , вазодилаторно деловање) активношћу простагландин синтазе.

2.7.3.2. Линеарни пут метаболизма арахидонске киселине

Медијатори инфламаторних процеса могу да настану и процесима који су катализовани липооксигеназама (LOX). У зависности од положаја двоструке везе арахидонске киселине на којој ће се извршити увођење кисеоника, разликују се 5-LOX, 12-LOX и 15-LOX. Овом реакцијом започиње липооксигеназни пут метаболизма арахидонске киселине, којим прво настаје нестабилна монохидропероксиенкозатетренска киселина (5-, 10- или 12-HPETE), која се редукује до монохидрокситетренске киселине (HETE) или леукотриена (LT). Поред њих, овим путем настају и липоксини, хепоксини, еоксини, резолвини, протектини и други.^{313,314}

2.7.3.3. Антиинфламаторни потенцијал лековитог биља

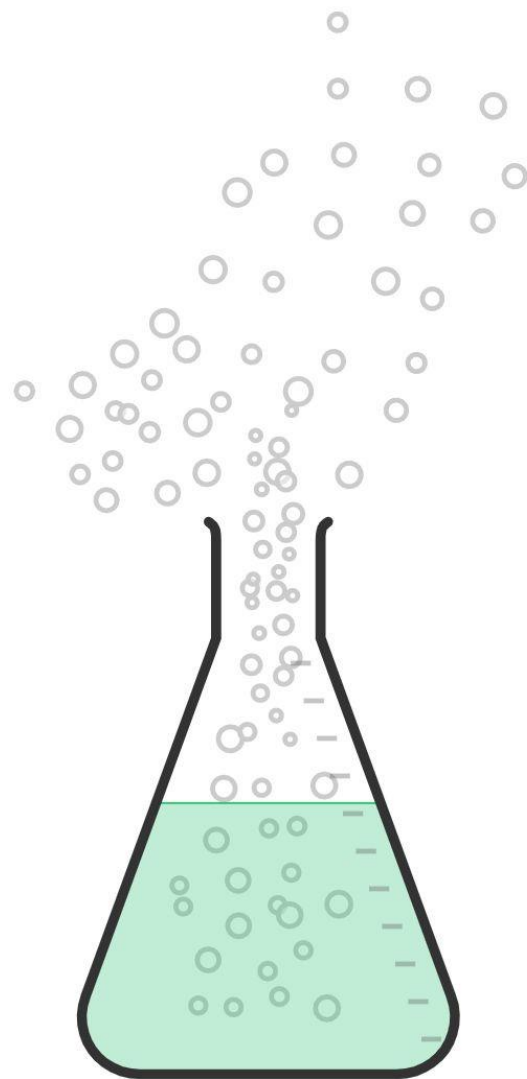
Као што је већ напоменуто, инфламација представља локализовани механизам одбране ткива који се јавља као одговор на оштећење ткива, а које се манифестује у виду бола, отока, црвенила, повишене температуре и смањене или изгубљене функције ткива. У циљу лечења инфламаторних обољења, до сада су употребљавани глукокортикоиди и развијени су многобројни стероидни и нестероидни неселективни антиинфламаторни лекови (SAIDs и NSAIDs), који испољавају инхибиторни ефекат на нивоу циклооксигеназа и самим тим утичу директно на синтезу простагландина. Конвенционални антиинфламаторни лекови попут диклофенака и аспирина припадају групи неселективних лекова, будући да се истовремено делују и на нивоу COX-1 и COX-2 и то онемогућавајући приступ арахидонске киселине активном центру циклооксигеназа. Међутим, већина ових лекова проузрокује негативне ефекте примарно на нивоу јетре и гастроинтестиналног тракта, као што су чир на желуцу и диспепсија. Узимајући у обзир да

се главни простагландини PGE₂, PGD₂, PGI₂ и други синтетишу у бубрезима, нуспојаве употребе NSAID лекова примећене су као последица инхибиције COX-1, а испољавају се на нивоу реналног система у виду папиларне некрозе, хиперкалемије и нарушене равнотеже електролита.³¹⁵

Иако постоје селективни антиинфламаторни лекови, попут целекоксиба, у савременој науци је примећена тенденција проналажења селективних инхибитора COX-2 из природних извора. Традиционална знања о биљкама одувек су примењивана и за смањење бола и повишене температуре и ублажавање отока и црвенила. У те сврхе су најчешће били употребљавани цвет камилице, кора врбе, хајдучка трава, коприва, кантарион и друге биљке.^{316,317} Резултати истраживања спроведеног од стране Shrivastava и сар.³¹⁸ показали су да камилица доводи до инхибиције ослобађања простагландина E₂ у инфламацији индукованој липополисахаридом (LPS), као и да испољава селективно инхибиторно деловање на нивоу COX-2, без утицаја на експресију COX-1. Откривено је да флавоно апигенин, присутан у цвету камилице, испољава антиинфламаторно деловање редукујући оток код миша изазван карагеном. Поред тога, апигенин и лутеолин делују инхибиторно на активацију NF-κB (хетеродимерни транскрипциони фактор) и JNK (интрацелуларне N-терминалне киназе) индукованих TNF-α³¹⁹, док широко распрострањени флавонол кверцетин модулирајући NF-κB сигнални пут доводи до редукције проинфламаторних интерлеукина (IL-6), NO, COX-2 и фактора некрозе тумора (TNF-α).^{320,321} Антиинфламаторна активност лековитог биља може бити остварена модулацијом JAK/STAT и инхибицијом фосфатидилинозитол-3-киназа сигналног пута, којима се активирају разни медијатори инфламације, као као што је то доказано у случају епигалокатехин-галата изолованог из камилице.³²²

Новија истраживања показују да антиинфламаторне компоненте биљака у комбинацији са једном или више других материја доводе до могућих адитивних, синергистичких или антагонистичких ефеката. Синергизам, који подразумева повећање антиинфламаторне активности комбинације фитохемикалије у односу на антиинфламаторни потенцијал појединачних компонената, повезан је са повећањем биорасположивости, повећањем антиоксидативног капацитета и интераговањем са бактеријском флором дигестивног тракта.³²³ Актуелност ових истраживања и резултати до којих се долази охрабрују даља и детаљнија проучавања природних производа као компонената са потенцијалним антизапаљенским деловањем, као и тачно дефинисање њиховог механизма испољавања овог типа активности.

3. Радне хипотезе и циљеви истраживања



Базирајући се на чињеници да су биљке неодвојиви део нашег постојања и да човек свакодневно ступа у контакт са лековитим биљем путем било прехранбеног или терапеутског аспекта, идеја водила при спровођењу ових истраживања је била да се научној јавности предочи свеобухватни увид у фитохемијски профил и фармаколошки потенцијал биљака које су од етнофармаколошког значаја, а о којима не постоје релевантне научне информације. Оправданост оваквих истраживања огледа се и у глобалној тенденцији посматрања лековитог биља као неисцрпног ресурса за изоловање природних производа, са циљем даље примене у медицинске или индустријске сврхе. Један од примарних проблема са којима се етномедицина данас сусреће су недостаци података о биљкама и њиховим својствима који су поткрепљени објективним истраживањима, што је уочено и на примеру две лековите биљке које су предмет ове дисертације, *A. vulgaris* и *S. hortensis*.

Када је реч о *A. vulgaris*, литературни подаци су указали на то да су се у традиционалној медицини користили сви делови вирка, због чега су предмет ових истраживања били и корен и надземни део биљке. Са друге стране, узимајући у обзир слабо развијен корен биљке *S. hortensis*, једино се њени листови и цветови наводе у етнофармакологији као терапеутски делови чубра, па је у складу са тим одабрано да се истраживања спроведу користећи екстракт надземног дела чубра.

Кључне хипотезе овог истраживања биле су да су две одабране биљке богате фенолним једињењима, као једном од кључних детерминанти биолошке активности, и да оне поседују снажан биолошки потенцијал. Сматрано је, такође, да је њихова активност изражена и у биолошким системима, те да примена ових биљака може деловати протективно у стањима неких ткивних оштећења, са акцентом на она која у основи имају оксидативни стрес, те да степен овог ефекта директно зависи од репарације редокс равнотеже и нормализације нивоа антиоксидативних параметара у ткиву. Поред тога, претпостављено је и делом испитано да ли примена ових биљака не проузрокује негативне ефекте у здравом организму.

У циљу провере постављених хипотеза, конципирано је истраживање којим би се објединили резултати који би допринели расветљавању наведених претпоставки. С тим у вези, примењена је широка лепеза методолошких приступа, који обухватају анализе хемијског састава и биолошког деловања надземног дела и корена *A. vulgaris*, као и надземног дела *S. hortensis*.

Фитохемијски профил екстраката надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis* проучаван је применом више анализа:

1. UHPLC/DAD-(-)HESI/MS² хроматографска анализа екстракта;
2. Спектрофотометријска одређивања количине појединих класа фенола:
 - ☞ укупних фенолних једињења;
 - ☞ укупних флавоноида;
 - ☞ деривата хидроксициметне киселине;
 - ☞ полимерних антоцијана;
 - ☞ мономерних антоцијана;
 - ☞ кондензованих танина и
 - ☞ галотанина.

Испитивање биолошке активности реализовано је кроз огледе у *in vitro* и *in vivo* условима. У оквиру *in vitro* испитивања извршене су анализе утицаја екстракта на:

- ☞ неутрализацију слободних радикала;
- ☞ раст бактерија;
- ☞ раст плесни и квасаца;
- ☞ активност циклооксигеназа 1 и 2 и експресију гена за COX-2 и
- ☞ здраве ћелије коже (кератиноцити и фибробласти).

In vivo истраживања спроведена су са циљем процене потенцијала екстракта да превенирају и/или смање оксидативна оштећења на нивоу јетре, бубрега и тестиса пацова, која су изазвана цисплатином. Овај сегмент истраживања обухватао је неколико методолошких приступа:

1. Утицај цисплатине и екстракта на биохемијске параметре јетре, бубрега и тестиса у серуму експерименталних животиња путем UV-Vis одређивања

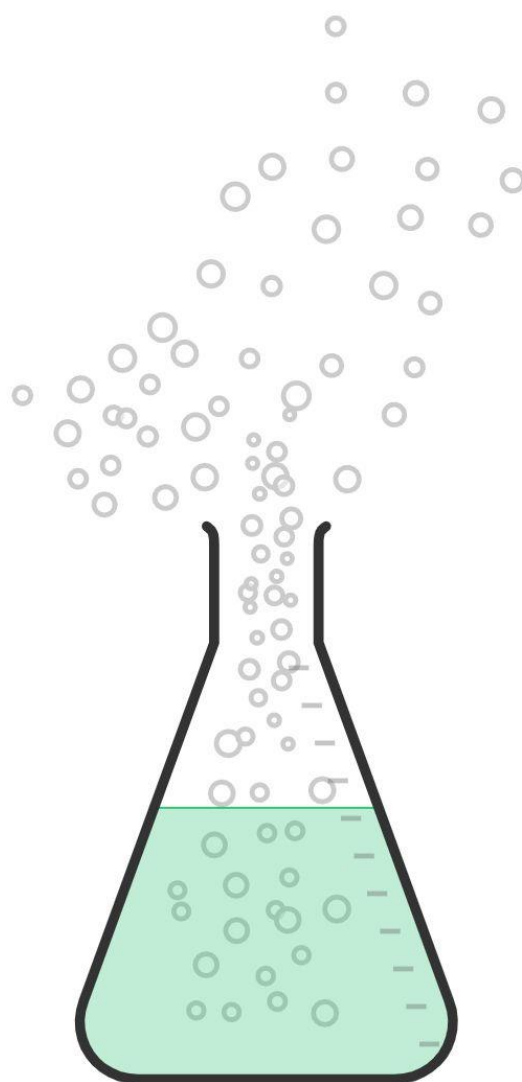
- ☞ количине укупних протеина;
- ☞ количине укупног билирубина;
- ☞ активности аланин аминотрансферазе;
- ☞ активности аспартат аминотрансферазе;
- ☞ активности алкалне фосфатазе;
- ☞ активности γ -глутамил трансферазе;
- ☞ количине урее;
- ☞ количине креатинина;
- ☞ количине мокраћне киселине и
- ☞ концентрације тестостерона.

2. Утицај цисплатине и екстракта на оксидативни статус јетре, бубрега и тестиса (хомогенати) путем спектрофотометријских анализа

- ☞ активности супероксид дисмутазе;
- ☞ активности каталазе;
- ☞ количине глутатиона и
- ☞ количине тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци.

3. Утицај цисплатине и екстракта на морфолошке промене у јетри, бубрезима и тестисима путем хистопатолошке анализе ткивних исечака.

4. Материјал и методе истраживања



4.1. Прикупљање и обрада биљног материјала и припрема екстраката

Истраживања у оквиру ове докторске дисертације вршена су на екстрактима надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis*.

Биљни материјал *A. vulgaris* (надземни део и корен) је сакупљан у јулу и августу 2014. године на планини Гоч (Република Србија) у фази пуног цвета. Таксономску и ботаничку детерминацију биљног материјала извршио је проф. др Милан Станковић, а примерак ове биљке депонован је у Хербаријуму Института за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу под бројем 120/015.



Слика 21. Осушени биљни материјал: А) надземни део и корен *A. vulgaris*, Б) надземни део *S. hortensis* (извор: Татјана Јурић, 2016).

Надземни део *S. hortensis* сакупљан је у месту Борач, општина Кнић (Република Србија), у августу 2015. године у фази цветања, а идентификација биљке спроведена је на Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета у Крагујевцу од стране проф. др Милана Станковића, а примерак биљке депонован је у ботаничкој збирци под бројем 121/015. Сакупљени биљни материјали сушени су на собној температури и у мраку, на промајном месту, до константне масе.

Осушени узорци (Слика 21) су самлевени у лабораторијском блендеру у циљу добијања финог праха и чувани су у папирним врећицама до припреме екстраката. Екстракти су припремани тако што је биљни материјал преливен метанолом и то у односу 1:5 (маса биљног материјала:запремина растварача) приликом припреме екстраката надземног дела и корена *A. vulgaris*, односно 1:10 (маса биљног материјала:запремина растварача) за екстракт надземног дела *S. hortensis*, у току 24 часа. Након мацерације у трајању од 24 часа, екстракти су процеђени преко филтер папира (Whatman No. 1), а мацерација је са истим биљним материјалом поновљена још два пута на идентичан начин у циљу ефикасније екстракције. Сакупљени екстракти су потом упарени на

ротационом вакуум упаривачу при температури од максимално 45 °C, како би се спречила деградација термолабилних једињења присутних у екстрактима. Упарени екстракти су потом остављени на собној температури на тамном месту до постизања константне масе, након чега су чувани на 4 °C. Принос екстракције је био 12,24% за екстракт надземног дела *A. vulgaris* (ABH), 16,12% за екстракт корена *A. vulgaris* (ABK), док је за надземни део *S. hortensis* (CXH) принос екстракције износио 15,38%, у односу на масу сувог биљног материјала. Сва израчунавања у оквиру ове дисертације базирана су на маси сувог екстракта.

4.2. UHPLC/DAD-(-)HESI-MS/MS анализа

Увид у детаљан хемијски профил биљака *A. vulgaris* и *S. hortensis* добијен је применом ултра-ефикасне течне хроматографије у комбинацији са UV-Vis детектором са низом диода (енг. *Diode array detector*, DAD) и масеним детектором са три анализатора—троструки квадрупол (UHPLC/DAD-(-)HESI-MS²).

Одређивање фенолних једињења и њихова квантификација у испитиваним екстрактима вршена је на Dionex Ultimate 3000 UHPLC систему (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany), састављеном од кватернерне пумпе са дегасером, термостатирајуће колоне, аутосемплера и детектора са низом диода, повезаним са троструким квадруполним масеним детектором (TSQ Quantum Access Max; ThermoFisher Scientific, Basel, Switzerland). Раздвајање компонената је вршено коришћењем Hypersil gold C18-колоне (димензије 50 × 2,1 mm, величина честица 1,9 μm; ThermoFisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) на 30 °C. Бинарна мобилна фаза се састојала од воде са 0,02% сирћетном киселином (А) и ацетонитрила (Б) (MS grade, Fisher Scientific, Loughborough, UK). Закишељавање мобилне фазе врши се у циљу сузбијања дисоцијације фенолних и карбоксилних група, што позитивно утиче на облик пикова раздвојених једињења. Градијентно елуирање вршено је према следећој шеми: 0-3 min 5-20% Б, 3-5 min 20-40% Б, 5-7,5 min 40-50% Б, 7,5-8,5 min 50-60% Б, 8,5-10,5 min 60-95% Б, 10,5-11,5 min 95% Б, 11,5-12 min 95-5% Б, и 5% Б до истека 15 минута. Проток растварача је подешен на 0,4 mL/min, а запремина инјектованог узорка (екстракта/стандарда) је била 10 μL. Опсег таласних дужина је био од 260 до 320 nm.

Као систем за увођење јона и њихову продукцију коришћена је електроспреј јонизација чији су параметри подешени на негативни поларитет ((-)-HESI), у *m/z* опсегу (однос маса/наелектрисање јона) 100-1000. Температура испаривача је подешена на 450 °C, док су параметри јонског извора били следећи: волтажа 3,51 kV, температура

испаривача 350 °C, брзина протока главног (енг. *Sheath*) гаса (N₂) 28 AU¹, а помоћног (енг. *Auxiliary*) гаса (N₂) 20 AU, док је напон прскалице (енг. *Skimmer*) био 0 V.

Како би настали фрагментни јони, дисоцијација молекула индукована је сударом јона молекула прекурсора са колизионим гасом (енг. *Collision-induced dissociation*). Као колизионни гас коришћен је аргон, а колизиона енергија је подешена на 30 eV.

Квалитативна анализа је вршена у моду за праћење изабраног фрагмента (енг. *Selected reaction monitoring*, SRM). Квантификација фенолних једињења вршена је методом екстерног стандарда. Ова процедура подразумева припрему и снимање серије стандардних раствора референтних једињења у различитим концентрацијама, на основу чијих калибрационих крива се читава концентрација датог једињења у узорцима. Одлична линеарност са коефицијентима корелације ($r = 0,990$ и $0,999$, $p < 0.001$) потврђена је регресионом анализом кривих за калибрацију добијених за стандардна једињења. Количина појединачних фенолних једињења у узорку квантификована је на основу површине пика и изражена је у μg по g сувог екстракта ($\mu\text{g/g}$).

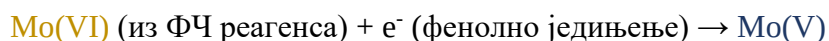
4.3. Методе за квантитативно одређивање фенолних једињења

4.3.1. Одређивање садржаја фенолних једињења у екстрактима

У циљу одређивања садржаја укупних фенолних једињења примењена је најчешће употребљавана метода која се базира на оксидо-редукционој реакцији између Фолин-Чокалтеовог реагенса (Folin-Ciocalteu, ФЧ реагенс) и фенолних једињења из биљних екстраката у базној средини.³²⁴

Фолин-Чокалтеов реагенс представља смешу фосфоволфрамове (H₃PW₁₂O₄₀) и фосфомолибденске киселине (H₃PMo₁₂O₄₀), као и соли литијума, које спречавају настајање замућења услед нестабилности и деградирања реагенса у базној средини. Иако је прецизан механизам реакције још увек непознат, претпоставља се да је основна реакција трансфер електрона са полифенолних једињења, при чему се она оксидују, а редукција Фолин-Чокалтеовог реагенса резултује формирањем плаве хромофоре која се састоји од смеше оксида волфрама (W₈O₂₃) и молибдена (Mo₈O₂₃). Оксидација фенолних једињења се одвија лако, будући да су она на радној рН (~10) присутна првенствено у облику фенолатних анјона. Интензитет насталог плавог обојења раствора читава се на 765 nm и пропорционалан је садржају укупних фенола у узорку.

¹ AU-арбитрарна јединица (енг. *Arbitrary unit*)



Реагенси

- 1) 0,2 М Folin-Ciocalteu реагенс;
- 2) 75 g/L NaHCO₃;
- 3) Метанолни екстракти *A. vulgaris* и *S. hortensis* у метанолу у концентрацији 0,1 mg/mL.
- 4) Стандардни раствор галне киселине у метанолу концентрације 1 mg/mL.

Процедура

100 µL метанолног раствора екстракта помешано је са 500 µL Фолин-Чокалтеовог реагенса и 400 µL NaHCO₃, након чега је реакциона смеша инкубирана на 45 °C у мраку у току 15 минута. Паралелно је припремљена и слепа проба, у коју је уместо екстракта додата иста запремина метанола. Упоредо је припремљена и серија од дванаест разблажења стандардних метанолних раствора галне киселине у концентрацијама од 0,05 до 1 mg/mL. Апсорбанција реакционе смеше је, по истеку периода инкубације, мерена спектрофотометријски на $\lambda_{\text{max}}=765 \text{ nm}$. Двозрачни UV-Vis спектрофотометар Halo DB-20S (Dynamica GmbH, Швајцарска) коришћен је за сва наредна спектрофотометријска мерења.

Вредности очитане за апсорбанцу раствора галне киселине екстраполиране су на графику у функцији зависности од концентрације, на основу којег је одређена једначина калибрационе криве. Садржај укупних фенолних једињења је израчунат базирајући се на добијеној једначини и резултати су изражени у милиграмима еквивалената галне киселине по граму масе сувог екстракта (mg ЕГК/g екстракта).

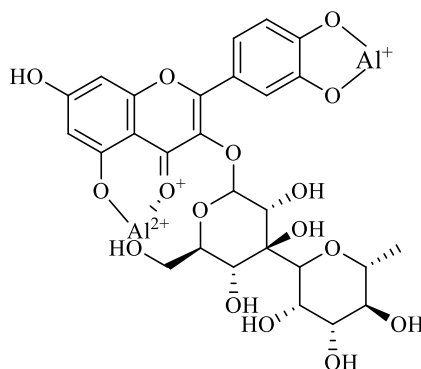
4.3.2. Одређивање садржаја флавоноида у екстрактима

За одређивање укупних флавоноида у испитиваним екстрактима примењена је метода³²⁵ која се базира на реакцији комплексирања између AlCl₃ и хидроксилне групе у положају С3 и С5 и кето групе на С4 флавона и флавонола (Слика 22), чиме настаје жуто обојени производ, стабилан у киселој средини, чији је интензитет обојења на 415 nm пропорционалан количини флавоноида у испитиваном узорку.

Реагенси

- 1) 0,15 М AlCl₃ у метанолу;
- 2) Метанолни екстракти растворени у метанолу у концентрацији 0,25 mg/mL;

3) Стандардни раствор рутина у метанолу (концентрација основног раствора 1 mg/mL).



Слика 22. Комплексирање рутина алуминијумом

Процедура

Помешана је иста запремина екстракта (или стандардног раствора рутина) и AlCl_3 (500 μL) и апсорбанца насталог жутог комплекса мерена је спектрофотометријски на 415 nm након једночасовне инкубације на собној температури. Упоредо је припремљена проба за корекцију боје која потиче од узорка (уместо AlCl_3 екстракту је додат метанол), чија је вредност одузета од вредности за апсорбанцу узорка помешаног са реагенсом. Слепа проба је припремљена са метанолом. Како би се конструисала калибрациона крива, направљена је серија од десет разблажења кверцетин-3-О-рутинозида (рутина) у распону концентрација 0-200 $\mu\text{g/mL}$. Резултати су изражени у еквивалентима рутина као средња вредност три узастопна мерења $\pm$ стандардна девијација (mg EPY/g екстракта).

4.3.3. Одређивање садржаја хидроксициметних киселина

Хидроксициметне киселине присутне у екстрактима *A. vulgaris* и *S. hortensis* квантитативно су одређене UV-Vis методом заснованом на реаговању орто-дихидрокси фенолне групе хидроксициметних киселина са хромогеним системом HCl - NaNO_2 - Na_2MoO_4 - NaOH .³²⁶

Реагенси

- 1) 0,5 М раствор HCl ;
- 2) Арнов реагенс (10% NaNO_2 и 10% Na_2MoO_4 помешани у односу 1:1);
- 3) 1 М NaOH ;
- 4) Метанолни раствори екстракта у концентрацији 0,5 mg/mL;

5) Стандардни раствор кафеинске киселине у метанолу (1 mg/mL).

Процедура

У 100 μL екстракта (или стандардног раствора кафеинске киселине) додато је 500 μL дестиловане воде и по 100 μL HCl, Арновог реагенса, NaOH и дестиловане воде. Одмах по додатку свих реагенаса читава се апсорбанција наранџасто-црвеног комплекса на 490 nm. Слепа проба је припремљена са метанолом уместо узорка. Квантификација деривата хидроксициметних киселина вршена је на основу калибрационе криве за кафеинску киселину (распон концентрација 0-400 $\mu\text{g/mL}$). Резултати су представљени као средња вредност три радне пробе $\pm$ стандардна девијација и изражени у милиграмима еквивалената кафеинске киселине по граму екстракта (mg ЕКК/g екстракта).

4.3.4. Одређивање садржаја антоцијана у екстрактима

Промена у рН вредностима раствора доводе до реверзibilних структурних промена у хромофори антоцијана. Захваљујући присуству осам конјугованих двоструких веза у структури антоцијана, при рН нижем од 3,0, слободни антоцијани су стабилни и присутни као флавилијум катјони специфичне црвене боје, док се при вишим рН (4-5) формира безбојни хемикетал, што резултује променама у апсорпционом спектру антоцијана (Схема 8). У базној средини, боја антоцијана се мења у плавкасту.³²⁷

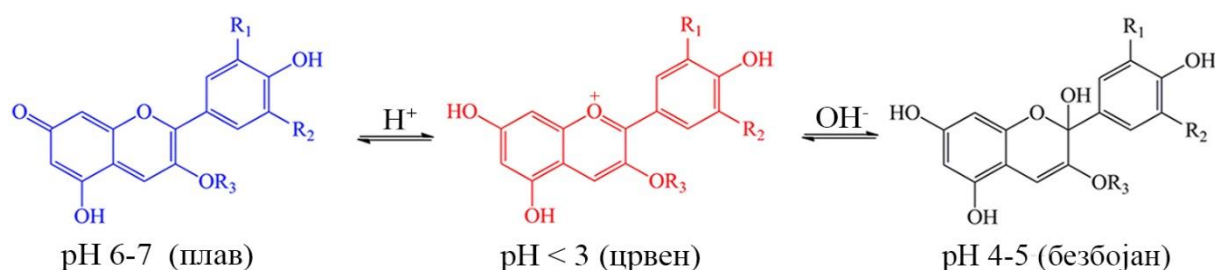


Схема 8. Реверзibilна промена структуре антоцијана у зависности од промене рН средине³²⁸

Реагенси

- 1) 0,025 М KCl/HCl пуфер рН 1,0;
- 2) 0,4 М $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ пуфер рН 4,5;
- 3) Метанолни екстракти растворени у метанолу у концентрацији 1 mg/mL.

Процедура

Метанолни екстракти *A. vulgaris* и *S. hortensis* разблажени су пуфером рН 1 десет пута како би се постигла апсорбанца $\sim 0,7$. У пет епрувета се дода по 200 μL разблаженог екстракта. У три епрувете се дода 1,8 mL пуфера рН 1, а у преостале две пуфер рН 4,5. Као слепа проба коришћени су пуфери рН 1, односно рН 4,5. Након 30 минута инкубације мерена је апсорбанца на две таласне дужине, $\lambda_{\text{max}}=520 \text{ nm}$ и $\lambda=700 \text{ nm}$. Садржај недеградираних и полимерних антоцијана је изражен у милиграмима еквивалената цијанидин-3-глукозида (mg ЕЦЗГ/ g екстракта), а израчунат је на основу формула:

$$C_{\text{слободних антоцијана}} = \frac{((A_{\lambda=520 \text{ nm}} - A_{\lambda=700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1} - (A_{\lambda=520 \text{ nm}} - A_{\lambda=700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}) \times M \times F \times 1000}{\epsilon \times l}$$

$$C_{\text{укупних антоцијана}} = \frac{((A_{\lambda=520 \text{ nm}} - A_{\lambda=700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1} \times M \times F \times 1000)}{\epsilon \times l}$$

Где је:

A – апсорбанца очитана на наведеној таласној дужини у раствору наведене рН вредности;

M – моларна маса цијанидин-3-глукозида (449,2 g/mol);

F – фактор разблажења екстракта ради постизања апсорбанце $\sim 0,7$ (10);

ϵ – моларни апсорпциони коефицијент цијанидин-3-глукозида (26900 L/(mol*cm));

l – дужина оптичког пута кивете (1 cm).

4.3.5. Одређивање садржаја проантоцијанидина у екстрактима

Кондензовани танини (проантоцијанидини) у екстрактима *A. vulgaris* и *S. hortensis* одређивани су методом селективног таложeња помоћу формалдехида у присуству флороглуцинола у киселој средини (Схема 9).³²⁹

Реагенси

1) Флороглуцинол;

2) 4,2 M HCl;

3) 1,3 M формалдехид;

4) Метанолни екстракти растворени у метанолу (концентрације 200 mg/mL).

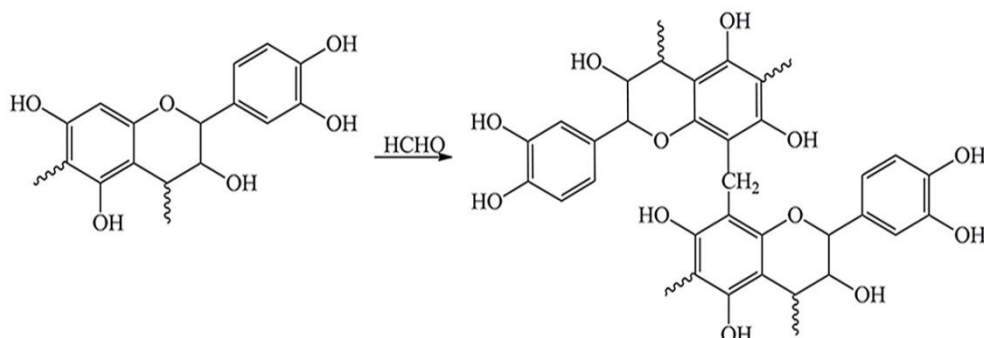


Схема 9. Реакција формирања метилenskог моста између А-прстена танина и формалдехида у киселој средини, при чему долази до таложења танина³³⁰

Процедура

Како би се одредили проантоцијанидини у екстрактима, неопходно је прво одредити количину укупних фенолних једињења користећи Фолин-Чокалтеов реагенс. На основу добијених података, одређује се маса флороглуцинола коју је потребно додати екстракту како би се исталожили кондензовани танини; за сваки еквивалент галне киселине додаје се 0,5 mol еквивалената флороглуцинола. Након додавања израчунате масе флороглуцинола, у 2 mL раствора екстракта (200 mg/mL) додаје се по 1 mL HCl (4,2 M) и HCHO (1,3 M) и остави се 24 сата у мраку да се танини исталоче. Након тога се раствор процеди. Супернатант се потом разблажи до концентрације 0,1 mg/mL и у њему се одређују укупна фенолна једињења по већ описаној процедури, а количина кондензованих танина се одређује из разлике укупних фенола у екстракту и супернатанту и изражава се у милиграмима еквивалената галне киселине у граму екстракта (mg ЕГK/g екстракта). Резултат подразумева средњу вредност три узастопна мерења $\pm$ стандардна девијација. Као слепа проба коришћен је метанол.

4.3.6. Одређивање количине хидролизабилних танина

За одређивање хидролизабилних танина у екстрактима примењена је метода која се темељи на реакцији оксидације галоил естара калијум-јодатом (KIO_3)³³¹, у којој се формира црвена хромофора чији се интензитет обојења прати спектрофотометријски на $\lambda_{\text{max}}=550 \text{ nm}$.

Реагенси

- 1) Засићени раствор KIO_3 ;
- 2) Метанолни екстракти растворени у метанолу (1 mg/mL);
- 3) Стандардни раствор галне киселине у метанолу (1 mg/mL).

Процедура

750 μL засићеног раствора калијум-јодата додато је у 1,75 mL екстракта, након чега је смеша инкубирана на воденом купатилу на 40 °C до појаве црвенкастог обојења. Паралелно је припремљена и серија раствора галне киселине у распону концентрација 0-500 $\mu\text{g/mL}$. Као слепа проба коришћен је метанол. Интензитет црвеног обојења је потом праћен спектрофотометријски на 550 nm све до постизања максималне вредности за апсорбацију узорка. Калибрациона крива је конструисана као зависност апсорбанце стандардних раствора галне киселине од концентрације и на основу једначине праве одређена је количина галотанина у екстрактима (mg ЕГК/g екстракта).

4.4. *In vitro* испитивање антиоксидативног потенцијала екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis*

4.4.1. Одређивање DPPH• „скевинцер“ капацитета екстракта

DPPH• (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) метода је једна од најчешће примењиваних процедура за процену антиоксидативног капацитета биљних екстракта. Широкој распрострањености допринела је чињеница да је љубичасто обојени DPPH• веома стабилан у радикалској форми. Присуство неспареног електрона на азоту, чија делокализација обухвата слободно кретање по целој структури молекула, а не у његовом специфичном сегменту, спречава димеризацију молекула и формирање лабилне структуре карактеристичне за радикале. Поред тога, DPPH• је комерцијално доступан, не захтева специфичну опрему за анализу и економски је исплатив. Ипак, примарни недостатак који се приписује овом тесту је одсуство кисеоника у структури DPPH•, као и непостојање DPPH• у биолошким системима, али због претходно наведених предности и даље представља незаобилазни тест у прелиминарној процени антирадикалског капацитета екстракта, секундарних метаболита биљака и синтетисаних једињења.

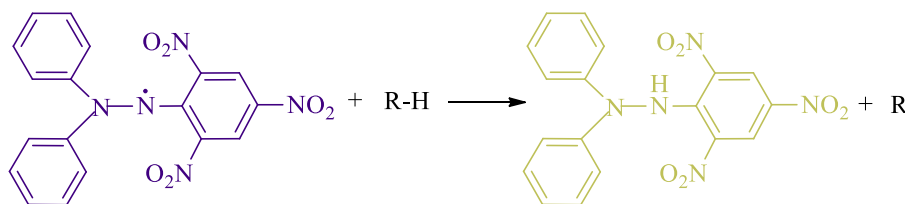


Схема 10. Редукација љубичасто обојеног DPPH• радикала до жутог DPPH у присуству антиоксиданата

Реакција неутрализације DPPH• радикала (Схема 10) базира се на трансферу електрона са антиоксиданта на радикал, што доводи до стварања интермедијерног радикала који потом апстрахује протон, неутралише се и прелази у дијамагнетични DPPH-H, узрокујућу промену боје раствора из љубичасте у жућкасту. Редукција интензитета љубичастог обојења пропорционална је антиоксидативном капацитету узорка. Метода коју су адаптирали Kumarasamy и сар.³³² коришћена је за мерење антиоксидативног капацитета екстраката и стандарда.

Реагенси

- 1) Раствор DPPH• у метанолу (80 µg/mL);
- 2) Метанолни екстракти растворени у метанолу (0,25 mg/mL);
- 3) Стандардни раствори природних и синтетских антиоксиданата (елагинска киселина, катехин, БХТ) у метанолу у концентрацији 0,1 mg/mL.

Процедура

Направи се серија од осам дуплих разблажења узорка (250-1,95 µg/mL) и стандарда (100-0,78 µg/mL) у метанолу. У 1 mL разблаженог узорка додат је 1 mL DPPH•, након чега је смеша инкубирана пола сата у мраку. Паралелно је припремљен и узорак следеће пробе са метанолом уместо узорка. Корекција апсорбанце која потиче од боје узорка је припремана са метанолом уместо DPPH•. Интензитет обојења након истека реакционог времена прати се спектрофотометријски на $\lambda_{\max}=517\text{ nm}$. Математички израз је примењен у прорачуну процента инхибиције стварања DPPH• радикала:

$$\text{Инхибиција (\%)} = \frac{A_{\text{слепа проба}} - (A_{\text{узорак}} - A_{\text{корекција узорка}})}{A_{\text{слепа проба}}} \times 100\%$$

На основу добијених података, конструисана је сигмоидна крива зависности процента инхибиције од концентрације узорка (dose-response) коришћењем софтвера за обраду података OriginPro 8 (OriginLab Corporation, MA, USA), чиме су добијени параметри неопходни за одређивање концентрације која доводи до 50% инхибиције радикалског деловања (IC₅₀). Све пробе су вршене у три узастопна понављања, а резултат је изражен као средња вредност IC₅₀ ± стандардна девијација.

4.4.2. Одређивање способности неутрализације ABTS^{•+} радикал катјона

ABTS (2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) метода је, уз

неутрализацију DPPH• радикала, најчешће примењивана метода за процену антиоксидативне способности једињења или екстраката. *Схема 11* приказује механизам неутрализације ABTS радикала у присуству антиоксиданата. Степен неутрализације ABTS је испитан методом развијеном од стране Re и сар.³³³

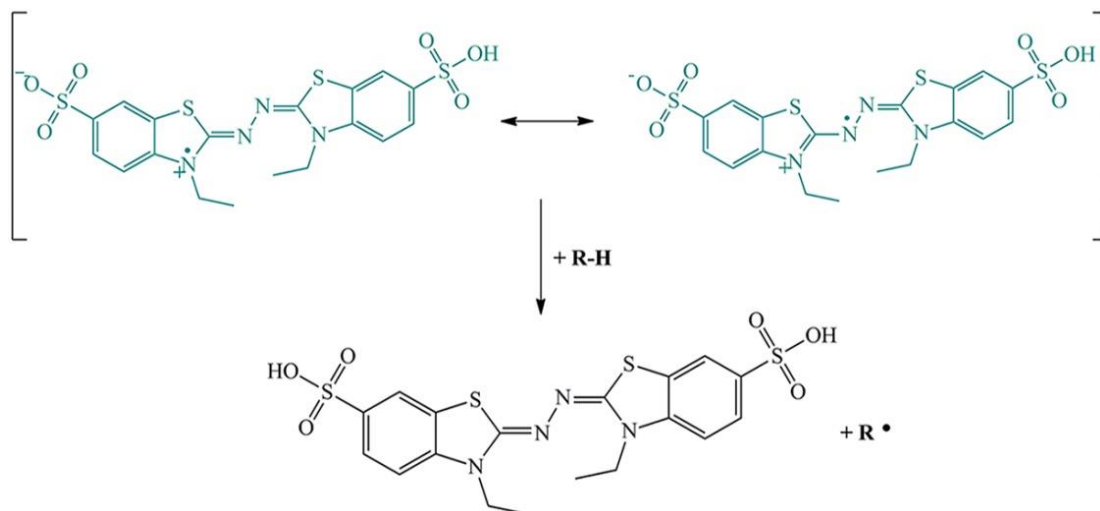


Схема 11. Неутрализација ABTS у присуству антиоксиданата

Реагенси

- 1) 7 mM ABTS (растворен у води);
- 2) 2,45 mM K₂S₂O₈ (растворен у води);
- 3) Метанолни екстракти растворени у метанолу (0,25 mg/mL);
- 4) Стандардни раствори природних и синтетских антиоксиданата (елагинска киселина, катехин, БХТ) у метанолу у концентрацији 0,1 mg/mL.

Процедура

Како би се генерисао ABTS, водени раствори ABTS и K₂S₂O₈ су помешани и остављени у мраку 16 сати. На дан анализе, раствор је разблажен метанолом у циљу постизања апсорбанце раствора ~0,7 на $\lambda_{\text{max}}=734$ nm. Полазни раствори екстраката и стандардних антиоксиданата двоструко су разблажени у метанолу у серији од осам концентрација (250-1,95 $\mu\text{g/mL}$ за екстракте и 100-0,78 $\mu\text{g/mL}$ за стандарде). У 100 μL екстракта/стандарда додато је 900 μL раствора ABTS^{•+}. Након полчасовне инкубације у мраку, измерена је апсорбанца узорка на 734 nm. Слепа проба је припремана са метанолом, а паралелно са сваком концентрацијом екстракта припремљена је и корекција узорка (метанол уместо ABTS^{•+}).

На основу добијених вредности за апсорбанцију, подаци се даље обрађују у циљу добијања IC₅₀ вредности на начин детаљно описан у DPPH• методи. Све анализе су

спроведене у три понављања, а резултати су представљени као средња вредност $IC_{50} \pm$ стандардна девијација.

4.4.3. Способност неутрализације $\cdot OH$ радикала

Принцип одређивања капацитета неутрализације хидроксил радикала одређује се методом која је први пут описана од стране Chung и сар.³³⁴ Хидроксил радикал је присутан у биолошким системима и представља један од најреактивнијих слободних кисеоничних радикала. Први корак у раду је генерисање хидроксил радикала Фентоновом реакцијом између Fe^{3+} и водоник пероксида (H_2O_2) у присуству редукујућег агенса (аскорбинска киселина). Настали хидроксил радикал потом оксидује 2-деокси-D-рибозу дајући низ продуката који реагују са тиобарбитурном киселином (ТВА) на повишеној температури и ниском рН, дајући интензивну ружичасту боју раствора на $\lambda_{max}=532\text{ nm}$.

Реагенси

- 1) 1 mM $FeCl_3$ (растворен у води);
- 2) 1 mM ЕДТА (растворена у води);
- 3) 1 mM аскорбинска киселина (растворена у води);
- 4) 14 mM 2-деокси-D-рибоза (растворена у води);
- 5) 10 mM H_2O_2 (растворен у води);
- 6) 10% ТСА са 0,5% ТВА, у води;
- 7) Метанолни екстракти растворени у води (0,5 mg/mL);
- 8) Стандардни раствори природних и синтетских антиоксиданата (елагинска киселина, катехин, БХТ) у метанола (0,5 mg/mL).

Процедура

Направљена је серија од осам двоструких разблажења екстракта и стандарда (500-3,91 $\mu\text{g/mL}$). Радне пробе су припремане мешањем 200 μL екстракта/стандарда, 200 μL $FeCl_3$, 100 μL аскорбинске киселине, 100 μL ЕДТА, 200 μL 2-деоксирибозе и 100 μL H_2O_2 . Пробе су потом инкубирани на 37 °C у току сат времена. Контролна проба је садржала дестиловану воду уместо аликвота екстракта. По истеку реакционог периода, раствору је додат 1 mL смеше ТСА-ТВА, након чега су епрувете загреване 30 минута на кључалом воденом купатилу. Након хлађења, интензитет насталог ружичастог обојења мерен је спектрофотометријски на 535 nm. IC_{50} вредност израчуната је на претходно

описан начин. Пробе су рађене у три понављања, а резултати су исказани као њихова средња вредност $\pm$ стандардна девијација.

4.4.4. Одређивање укупне антиоксидативне способности екстракта

Присуство антиоксидативних компонената у биљним екстрактима, као и процена укупног антиоксидативног потенцијала у односу на стандардне антиоксиданте испитује се по процедури развијеној од стране Prieto и сар.³³⁵ У присуству антиоксидантног једињења долази до редукције фосфомолибдена (VI) до фосфомолибдена (V) при ниским рН вредностима, а интензитет зелене боје насталог комплекса се мери спектрофотометријски на $\lambda_{\text{max}} = 695 \text{ nm}$.

Реагенси

- 1) Фосфомолибден реагенс (раствор се прави мешањем $4 \text{ mM } (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4 \text{ H}_2\text{O}$ у $0,6 \text{ M}$ сумпорној киселини, након чега му се дода $28 \text{ mM Na}_3\text{PO}_4$);
- 2) Аскорбинска киселина, растворена у води (1 mg/mL);
- 3) Раствор екстракта у метанолу (1 mg/mL).

Процедура

У епрувете са запушачем додато је $300 \text{ }\mu\text{L}$ екстракта и 3 mL фосфомолибден реагенаса, након чега је смеша загревана на воденом купатилу ($95 \text{ }^\circ\text{C}$) током $1,5 \text{ сат}$. Паралелно је припремљена и серија од осам двоструко разблажених стандардних раствора аскорбинске киселине у распону концентрација $1000 - 7,8 \text{ }\mu\text{g/mL}$, који су третирани на исти начин. Након хлађења до собне температуре, апсорбанца је мерена на $\lambda_{\text{max}}=695 \text{ nm}$. На основу једначине праве добијене конструисањем калибрационе криве стандардног раствора аскорбинске киселине, одређује се укупни антиоксидативни капацитет екстракта. Резултати су изражени у милиграмима еквивалената аскорбинске киселине по граму екстракта (mg AK/g екстракта) и представљају средњу вредност три паралелна мерења $\pm$ стандардна девијација.

4.4.5. Одређивање способности редукције јона метала

Редукциони потенцијал антиоксиданата представља способност једињења да врши трансфер електрона и редукује друге компоненте присутне у систему (SET механизам). За процену редокс капацитета екстракта примењена је ферицијанидна

метода коју су публиковали Оуаизу и сар.³³⁶, а која се заснива на реакцији редукције фери јона гвожђа (Fe^{3+}) до његовог феро облика (Fe^{2+}). Интензитет насталог комплекса пруско плавог (Fe^{3+} је координативно везан за азот, док Fe^{2+} гради координативну везу са угљеником (Схема 12), пропорционалан је редукционој способности екстраката.

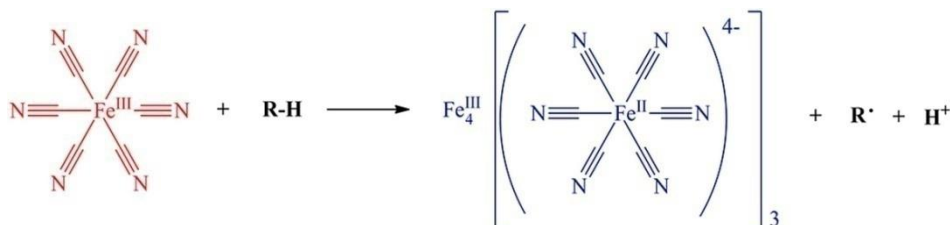


Схема 12. Редукција Fe^{3+} (калијум-хексацијаноферата(III)) до Fe^{2+} (пруско плаво, комплекс гвожђе(III)хексацијаноферат(II)) у присуству антиоксиданата.

Реагенси

- 1) 0,2 М натријум фосфатни пуфер (pH 6,6);
- 2) 1% водени раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$;
- 3) 10% водени раствор трихлорсирћетне киселине (ТСА);
- 4) 0,1% водени раствор FeCl_3 ;
- 5) Метанолни раствори екстраката у метанолу (0,5 mg/mL);
- 6) Стандардни раствори антиоксиданата (елагинска киселина, катехин, БХТ) у метанолу (0,5 mg/mL).

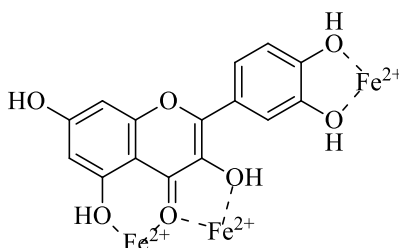
Процедура

Направљена је серија од осам двоструко разблажених метанолних раствора екстраката и стандардних антиоксиданата (500-3,91 $\mu\text{g/mL}$). Екстракти/стандарди, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ и фосфатни пуфер су помешани у једнаким запреминама (2,5 mL) и инкубирани у току 20 минута на 50 °C. Реакционој смеси је након тога додата иста запремина (2,5 mL) трихлорсирћетне киселине. Услед јављања талог у појединим узорцима, узорци су центрифугирани на 3000 обртаја у минути у току 15 минута. У 2,5 mL супернатанта потом додато је 2,5 mL дестиловане воде и 1 mL FeCl_3 , а интензитет развијеног плавог обојења (пруско плаво) се прати на 700 nm.

Резултати су представљени као график зависности апсорбанце на $\lambda_{\text{max}} = 700 \text{ nm}$ од концентрације екстракта/стандарда, при чему је виша вредност апсорбанце директно сразмерна већој редукционој способности антиоксиданта.

4.4.6. Одређивање способности хелирања јона метала

Генерисање слободних радикала у биолошким системима може бити последица постојања феро облика гвожђа (Fe^{2+}) који поседује способност трансфера електрона, стога везивање јона гвожђа и немогућност одвијања редокс реакција представља један од механизма антиоксидативне заштите. Хелирајући агенси делују антиоксидативно везујући се за двовалентно гвожђе (Слика 23), чиме се смањује његова количина, а самим тим индиректно и количина $\cdot\text{OH}$ радикала који се генеришу Фентоновом реакцијом у присуству Fe^{2+} . Капацитет екстракта да врше хелирање феро облика гвожђа испитивана је према методи модификованој од стране Chew и Lim³³⁷. Реакција се одиграва између ферозина и FeSO_4 , при чему се награђује комплекс црвене боје. У присуству једињења са хелатационим особинама, онемогућава се настајање овог комплекса, долази до деколорације раствора, а интензитет смањења обојења раствора сразмеран је хелатационом капацитету екстракта.



Слика 23. Хелатирање гвожђа (II) на примеру кверцетина.

Реагенси

- 1) 0,3125 mM водени раствор ферозина (натријум 4-[3-пиридин-2-ил-5-(4-сулфофенил)-1,2,4-триазин-6-ил]бензенсулфонат);
- 2) 0,125 mM водени раствор FeSO_4 ;
- 3) 0,1 mg/mL раствора ЕДТА;
- 4) Метанолни раствори екстракта у метанолу (1 mg/mL);
- 5) Стандардни раствори антиоксиданата (елагинска киселина, катехин, БХТ) у метанолу (1 mg/mL).

Процедура

Припремљена је серија од осам двоструких разблажења узорка/стандардних антиоксиданата/EDTA. Помешана је иста запремина (1 mL) узорка, гвожђе-сулфата и ферозина, након чега је реакциона смеша остављена на собној температури 10 минута. Као слепа проба коришћен је метанол. Апсорбанца је мерена на 562 nm, а IC_{50} вредност

је израчуната по већ описаном поступку. Резултати су дати као средња вредност три паралелне пробе $\pm$ стандардна девијација.

4.4.7. Инхибиција стварања липидних пероксида

Оксидација липида слободним радикалима један је од примарних узрока ужеглости масти, кварења намирница и измењених органолептичких својстава хране. Инхибиција липидне пероксидације у присуству екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis* одређује се применом тиоцијанатне методе.³³⁸ Оксидацијом линолне киселине на 37 °C у току три дана настају хидропероксиди, у чијем присуству се Fe^{2+} оксидује до Fe^{3+} . Количина насталих јона тровалентног гвожђа одређује се реакцијом са тиоцијанатом, у којој настаје једињење црвене боје. Интензитет обојења је пропорционалан количини Fe^{3+} у узорку, а самим тим и количини липидних пероксида и интензитету липидне пероксидације. Стога слабљење интензитета боје раствора у присуству антиоксиданата указује на способност екстракта да инхибира оксидацију линолне киселине (Схема 13).

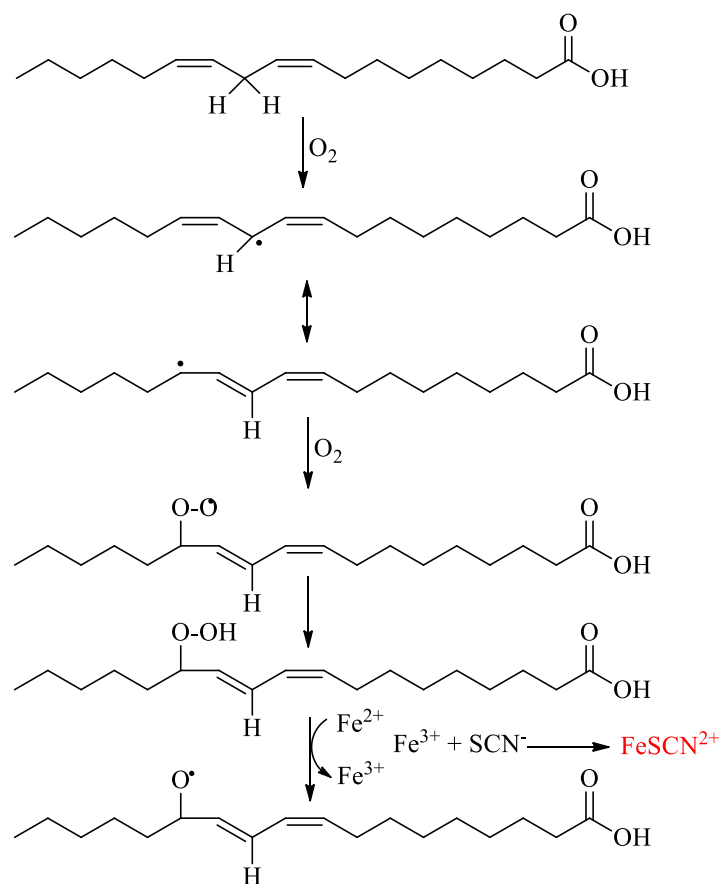


Схема 13. Генерисање липидних хидропероксида линолне киселине и реакција настајања црвеног комплекса Fe^{3+} са тиоцијанатом

Реагенси

- 1) 0,02 М емулзија линолне киселине (припремљена мешањем исте масе (0,2804 g) линолне киселине и Tween-40 у 50 mL натријум-фосфатног пуфера pH 7,0);
- 2) 0,2 М натријум-фосфатни пуфер;
- 3) 75% етанол;
- 4) 30% NH₄SCN;
- 5) 20 mM FeSO₄ припремљен у 3,5% HCl;
- 6) Раствор α-токоферола (1 mg/mL);
- 7) Метанолни екстракти растворени у метанолу (1 mg/mL);
- 8) Стандардни раствори антиоксиданата (елагинска киселина, катехин, епикатехин, БХТ) у метанолу (1 mg/mL).

Процедура

Припремљена је серија од осам двоструко разблажених раствора узорка, стандардних антиоксиданата и α-токоферола. У 500 μL узорка дода се 2,5 mL емулзије линолне киселине, те се смеша инкубира 72 сата на 37 °C. Слепа проба је припремана са метанолом уместо аликвота узорка. Након истека инкубационог периода, у 100 μL ове смеше додато је 4,7 mL етанола, 100 μL амонијум-тиоцијаната и 100 μL гвожђе (II) сулфата. Смеша је потом мешана на вортексу 3 минута, након чега је очитана апсорбанца на 500 nm.

Способност инхибирања стварања липидних пероксида представља се као IC₅₀ вредност, која се рачуна на претходно описан начин, а изражава као средња вредност три паралелна мерења ± стандардна девијација.

4.5. Антимикробна активност биљних екстраката

4.5.1. Коришћени микроорганизми

У циљу одређивања антибактеријске активности метанолних екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis* коришћени су стандардни (ATCC) сојеви и клинички изолати (FSB) бактерија (укупно 9), док је антифунгална активности испитивана на осам сојева плесни и једном квасцу. Приказ коришћених микроорганизама дат у оквиру Табеле 7.

Табела 7. Списак микроорганизама коришћених у испитивању антимикробне активности биљних екстраката

Бактерије		Гљиве	
<u>Грам негативне</u>		<u>Плесни</u>	
<i>Azotobacter chroococcum</i>	FSB 14	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	<i>Penicillium canescens</i>	FSB 24
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 70063	<i>Trichoderma viride</i>	FSB 11
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	FSB 13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	<i>Aspergillus glaucus</i>	FSB 32
<u>Грам позитивне</u>		<i>Fusarium oxysporum</i>	FSB 9
<i>Bacillus mycoides</i>	FSB 1	<i>Alternaria alternata</i>	FSB 51
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	<i>Doratomyces stemonitis</i>	FSB 41
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	ATCC 4698	<u>Квасац</u>	
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10259

Стандардни (ATCC) сојеви бактерија коришћени у овим експериментима обезбеђени су од стране Института за јавно здравље у Крагујевцу, док су изолати из биолошких узорака (FSB), плесни и квасац, обезбеђени од стране Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

4.5.2. Припрема микроорганизама за испитивање антимикробне активности

Први корак у процени антимикробне активности биљних екстраката је обезбеђивање свеже пресејаних микроорганизама. Бактеријске културе се засејавају на коси хранљиви агар (ХА), квасац *Candida albicans* на Sabouraud декстрозни агар (СДА), док су преостале плесни пресејаване на кромпир-глукозни агар (КГА). По пресејавању, бактеријске културе се инкубирају на 37 °C током 24 сата, плесни на 25 °C током 72 h, а *C. albicans* на 30 °C током 24 сата. Након тога, ћелије и споре су суспендоване у 5% раствору DMSO тако да број микроорганизама буде стандардизован на 0,5 јединица на McFarland-овој скали, којом се одређује степен замућења суспензије инокулума. Фотоколориметријском методом (колориметар Iskra MA 9507, Крањ, Словенија) уз коришћење зеленог филтера (који одговара таласној дужини од 550 nm) подешена је оптичка густина припремљених инокулума и то: за *C. albicans* и бактерије $O.D._{550nm} = 0,045$, што одговара концентрацији од $5,6 \times 10^6$ CFU/mL (Colony Forming Unit), док је за плесни $O.D._{550nm}$ износила 0,03 (1×10^4 CFU/mL).^{339–341}

4.5.3. Одређивање антимикробне активности екстраката микродилуционом методом

Антимикробна активност екстраката испитивана је микродилуционом методом описаном од стране Sarker и сар.³⁴², која је у складу са стандардизованим лабораторијским протоколом за испитивање антимикробне активности.^{339–341} Разлике између микродилуционе и дилуционе методе се огледају у томе да се у микродилуционој методи експеримент изводи у микроплочама са 96 удубљења са U дном, док се у дилуционој методи употребљавају епрувете. Поред тога, у микродилуционој методи се користи редокс индикатор ресазурин, који потпомаже визуализацију раста микроорганизама, будући да у присуству микроорганизама плаво обојени ресазурин прелази у розе облик, резорурфин (Схема 14).

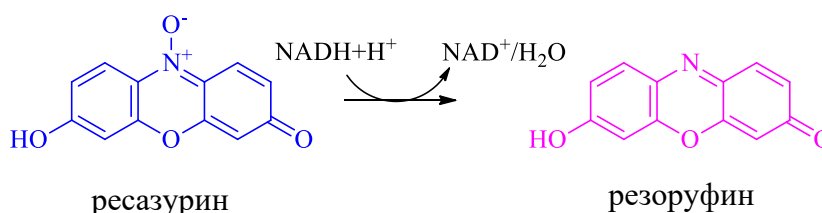


Схема 14. Редукција ресазурина до резорурфина у присуству микроорганизама

Реагенси

- 1) Müller–Hinton-ов бујон (МХП) – течна подлога;
- 2) Sabouraud декстрозни бујон (СДБ) – течна подлога;
- 3) 67,5 mg/mL ресазурина у стерилној дестилованој води;
- 4) Раствор антибиотика (хлорамфеникол и еритромицин; 10 µg/ mL) у стерилној дестилованој води;
- 5) Раствор антимикотика (нистатин и кетоконазол; 10 µg/mL) у стерилној дестилованој води;
- 6) Раствор референтних једињења (елагинска киселина и катехин; 1 mg/mL) у стерилној дестилованој води (претходно растворени у малој количини 5% диметил сулфоксида);
- 7) Раствори екстраката (40 mg/mL) у стерилној дестилованој води.

Процедура

У отворе микротитарске плоче у једној колони микропипетом је унето по 50 µL МХП за тестирање бактерија односно СДБ за гљиве. У прво удубљење у колони је додато 50 µL екстракта/референтних једињења/антибиотика/антимикотика дате концентрације,

након чега је направљена серија двоструких разблажења у оквиру колоне. На тај начин се добија 8 различитих концентрација испитиваних супстанци, а свака наредна је дупло разблаженија у односу на претходну. За испитивање антибактеријске активности, у сваку јамицу на микроплочи је потом додато по 10 μL ресазурина, 30 μL течне подлоге (МХП) и 10 μL суспензије бактеријских ћелија дефинисане густине. За процену антифунгалне активности додато је 40 μL течне подлоге (СДБ) и 10 μL суспензије спора гљива. Поред ове две колоне, последње две колоне су означене као контролне. Прва контрола је подразумевала контролу раста бактерија/гљива и у њу је уместо екстракта/стандарда/антибиотика/антимикотика додато 10 μL течне подлоге. Друга контрола је контрола стерилности подлоге, у коју је уместо суспензије спора додато 10 μL течне подлоге. Укупна запремина у свакој јамици је износила 100 μL . Микроплоче су потом инкубиране на 37 °C у трајању од 24 h за бактерије, на 30 °C за квасац *C. albicans* и на 28 °C за плесни, и то у току 72 h, након чега је извршено читавање минималних инхибиторних концентрација (МИК). За бактерије, МИК вредности подразумевају минималне концентрације при којима екстракт/стандард инхибирају раст бактерија, што се примећује на основу промене боје индикатора из плаве у розе. Последња прочитана концентрација у којој није дошло до промене боје индикатора означава минималну концентрацију при којој нема раста бактерија. У случају гљива, МИК вредности су одређиване на основу визуелног праћења раста микроорганизама, па је концентрација у последњој јамици у којој нема трагова замућења и раста плесни или квасца означена као минимална инхибиторна концентрација.

4.6. Одређивање антиинфламаторне активности биљних екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis*

4.6.1. Инхибиторна активност на нивоу циклооксигеназа

Неке од главних производа цикличног метаболизма арахидонске киселине представљају простагландини, а међу њима је најзаступљенији PGE_2 . Стога се за процену инхибиторног деловања екстракта на нивоу циклооксигеназе-1 (COX-1) и циклооксигеназе-2 (COX-2) примењује метода заснована на мерењу количине насталог PGE_2 путем ELISA теста, а према методи описаној од стране Fiebich и сар.³⁴³

Реагенси

1) 0,1 M TRIS/HCl-пуфер, pH 8,0;

- 2) Раствор за инкубацију: 0,1 М TRIS /HCl-пуфер (pH 8,0), 5 μ M хематина (у 0,1 М NaOH, па ресуспендован у TRIS-пуферу), 18 mM (-)-епинефрин (+)-битартарат и ензими (0,2 U);
- 3) 50 μ M Na₂EDTA (у TRIS пуферу);
- 4) 5 μ M арахидонска киселина, припремљена у смеси за инкубацију;
- 5) Ензимски пуфер, који садржи: 0,08 М TRIS-пуфер, 100 mg Tween 20 (у 100 mL пуфера) и 0,3 mM натријум диетилдитиокарбамат трихидрат, pH 8.0;
- 6) Раствори COX-1 и COX-2, припремљени у ензимском пуферу (12 U/аликвот);
- 7) 10% водени раствор мравље киселине;
- 8) EIA сет за ELISA тест: IgG микротитарске плоче, EIA пуфер, пуфер за испирање, алкална фосфатаза PGE₂ конјугат, простагландин E₂ стандард, pNpp супстрат, стоп раствор, фолије за затварање плоча);
- 9) Стандарди 1-7 (стандард 1 - 1950 μ L EIA пуфера и 50 μ L простагландин E₂ стандарда; стандард 2 - 500 μ L EIA пуфера и 500 μ L стандарда 1; стандард 3 - 500 μ L EIA пуфера и 500 μ L стандарда 2; на исти начин припремати све стандарде све до стандарда 7 - 500 μ L EIA пуфера и 500 μ L стандарда 6).
- 10) Раствори екстракта (50 μ g/mL, у диметил сулфоксиду);
- 11) Раствори стандардних једињења за позитивну контролу (1,25 μ M индометацин у етанолу за COX-1, а 5 μ M NS-398 у етанолу за COX-2).

Процедура

За анализу COX-1, у микротитарским плочама са 96 удубљења са равним дном отпипетира се 20 μ L TRIS/HCl-пуфера, док се за COX-2 пипетира 10 μ L TRIS/HCl-пуфера и 10 μ L Na₂EDTA. Затим се у свако удубљење дода по 50 μ L раствора епинефрина, 10 μ L екстракта/стандарда, затим 100 μ L раствора ензима и 10 μ L раствора хематина, након чега се смеша инкубира у току 5 минута. Како би се започела реакција, додаје се 10 μ L раствора арахидонске киселине и добијена смеша се потом инкубира 20 минута на 37 °C на ротирајућем воденом купатилу. Реакција настајања PGE₂ из арахидонске киселине зауставља се додатком 10% мравље киселине у запремини од 10 μ L. Као контролни узорци постављене су пробе које садрже 10 μ L пуфера уместо узорка. Узорци са инкубационе плоче су растворени у циљу одређивања ELISA методом и то тако што је за COX-1 методу коришћено 10 μ L инкубираног узорка и 190 μ L EIA пуфера, док је за COX-2 методу узето 5 μ L инкубираног узорка и 195 μ L EIA пуфера.

ELISA анализа започиње додавањем 100 μ L EIA пуфера у свако удубљење на

ELISA плочи, са изузетком удубљења за неспецифично везивање (енг. *Non-specific binding*; NSB) где се додаје 150 μL EIA пуфера. Након тога се додаје 100 μL инкубираних узорака/стандарда. У свако удубљење, осим удубљења за укупну активност (ТА) и следеће пробе, дода се 50 μL PGE_2 конјугата и 50 μL антитела (у свако удубљење осим NSB, ТА и следеће пробе). Затим се смеша затвара фолијом из сета и оставља на инкубацији 2 сата са константним мешањем на шејкеру за микроплоче. Након истека периода инкубације, плоча се испира три пута са 200 μL пуфера за испирање, а потом се у ТА удубљење дода 5 μL PGE_2 конјугата. У свако удубљење се дода 200 μL рNpp супстрата и смеша се након тога инкубира 1 сат. Прекид реакције врши се додатком 50 μL стоп-раствора. Апсорбанца раствора у удубљењима микроплоче мери се на $\lambda_{\text{max}}=405 \text{ nm}$ помоћу UV читача микротитарских плоча (Tecan Rainbow, Tecan Group Ltd., Maennedorf, Швајцарска), при чему се бланко корекција читава између 570 и 590 nm. Инхибиторна активност екстракта на нивоу COX-1 и COX-2 ензима процењује се као смањење настанка PGE_2 у односу на слепоу пробу без присуства инхибитора. Проценат инхибиције ензима израчунат је коришћењем израза:

$$\% \text{ инхибиције COX} = \frac{A_{\text{слепа проба}} - A_{\text{узорка}}}{A_{\text{слепа проба}}} \times 100\%$$

4.6.2. Испитивање инхибиције COX-2 механизмом инхибиције експресије NF- κB /COX-2 гена

Како би се утврдио механизам инхибиторног деловања екстракта на нивоу COX-2 ензима, испитивана је инхибиција експресије COX-2 гена путем експресије његовог регулатора, нуклеарног фактора капа Б (NF- κB). NF- κB је транскрипциони фактор присутан у скоро свим еукариотским ћелијама, где регулише експресију гена укључених у различите физиолошке процесе, као што су диференцијација и пролиферација ћелија, апоптоза и имуни одговори. Поред тога, NF- κB заузима значајно место у инфламаторним процесима, будући да индукује широк дијапазон гена којима се регулише синтеза и експресија медијатора запаљења, као што су цитокини, циклооксигеназе и $\text{TNF-}\alpha$ ³⁴⁴

У циљу одређивања степена инхибиције експресије NF- κB /COX-2 гена деловањем екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis* коришћена је метода ланчане реакције полимеразе у стварном времену (енг. *Real time PCR*; RT PCR). Ова метода базира се на индуковању диференцирања THP-1 ћелија акутне моноцитне леукемије у макрофаге, при деловању форбол 12-миристат 13-ацетата (PMA), при чему долази до нагомилавања NF- κB у

цитоплазми. Инфламација индукована липополисахаридом (LPS) доводи до транслокације NF- κ B у једро, што је испраћено секрецијом TNF- α и активацијом циклооксигеназе-2.

Ћелијске линије

THP-1 ћелијска линија хумане акутне моноцитне леукемије засејане су на RPMI 1640 хранљивој подлози, уз додатак 2 mM L-глутамином, 10% феталног говеђег серума, 10 mM HEPES-а (N-2-хидроксиетилпиператин-N-2-етан сулфонска киселина), 100 U/mL пеницилина и 100 μ g/mL стрептомицина, а инкубација је вршена у атмосфери која садржи 5% CO₂ на 37 °C. За иницијацију стварања THP-1 моноцитних макрофага засејано је 1×10^6 ћелија у 20 јамица на микроплочи у RPMI 1640 медијуму који садржи 12 nM PMA у трајању од 48 сати. Након диференцијације макрофага, ћелије су третиране екстрактима *A. vulgaris* и *S. hortensis* (25 μ g/mL) у току једног сата, након чега су стимулисане са финалном концентрацијом LPS-а (7,5 ng/mL) (липополисахарид, Sigma, MO, USA) наредна 3 сата. Ћелије које су третиране са DMSO-ом коришћене су за калибрацију. Пре екстраховања РНК, ћелије су испиране три пута са хладним фосфатним PBS пуфером (енг. *Phosphate buffered saline*, Gibco®, Њујорк, САД) како би се одстраниле све незакачене ћелије.

4.6.2.2. Екстракција РНК и реверсна транскрипција ланчане реакције полимеразе (RT-PCR)

Комерцијално доступни сетови Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma, MO, САД) и High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Њујорк, САД) коришћени су у циљу одређивања укупне екстраховане РНК и реверсне транскрипције на комплементарну ДНК (сДНК), сходно назначеној употреби. Температура је подешена на 25 °C у трајању од 25 min, 37 °C у току 120 min и 85 °C у току 5 секунди. Концентрација РНК коришћена за реверсну транскрипцију била је 1 μ g за укупну запремину од 20 μ L сДНК (~ 40 ng/ μ L сДНК).

4.6.2.3. Real-time PCR

Испитивање експресије гена за COX-2 вршено је употребом комерцијално доступног сета Pre-developed Taq Man® Assay (Applied Biosystems, Њујорк, САД) на PCR-уређају ABI-7300 Real-Time PCR System. Запремина сДНК коришћена у real time PCR методи је 3 μ L (~110 ng cDNA). Умножавање циљане сДНК изведено је коришћењем

COX-2 прајмера: у правцу 5'-GAA-TCA-TTC-ACCAGGCAA-ATT-G-3', обрнуто 5'-TCT-GTA-CTG-CGG-GTG-GAA-CA-3' и COX-2 пробе: FAM-5'-TCC-TAC-CAC-CAG-CAACCC-TGC-CA-3'-TAMRA. Услови циклуса су подешени на: 50 °C у току 2 минута, 95 °C током 10 минута, а праћени са 40 PCR циклуса на 95 °C у трајању од 15 s и 60 °C у току 1 минута. Циљани гени су нормализовани на ниво глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназе (GAPDH) и релативно квантификовани коришћењем $2^{-\Delta\Delta CT}$ методе.^{345,346}

4.7. Биокомпатибилност екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis*

Одређивање степена биокомпатибилности, односно биолошког одговора ћелије на присуство испитиваних екстраката, вршено је на здравим ћелијама коже, фибробластима и кератиноцитима, са циљем да се одреди да ли екстракти испољавају негативно деловање на здраве ћелије или пак не доводе до промена, чиме се указује на њихову компатибилност са ћелијама и безбедну потенцијалну примену. Биокомпатибилност екстраката са здравим ћелијама испитивана је индиректно помоћу МТТ теста.³⁴⁷ Ова метода се базира на превођењу жуто обојене соли 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромида (МТТ) у плаво-љубичасто обојени 5-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-1,3-формазан, деловањем митохондријалне редуктазе, присутне једино у вијабилним (живим) ћелијама, уз стварање редукованих коензима NADH/H⁺ и NADPH/H⁺ (Схема 15).³⁴⁸

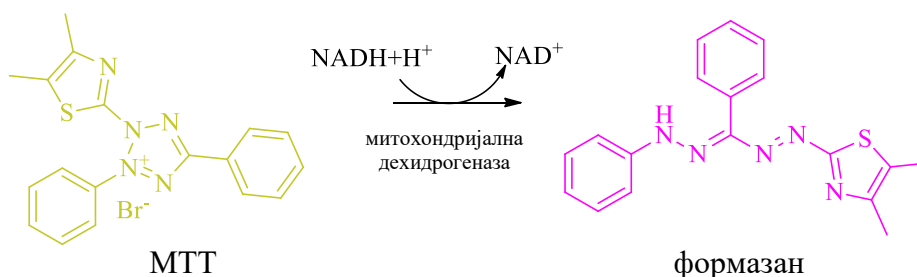


Схема 15. Редукција МТТ до љубичасто обојеног формаза у присуству митохондријалне дехидрогеназе

Ћелијске линије

У оквиру овог експеримента коришћена је 3Т3 ћелијска линија фибробласта лабораторијског миша соја BALB/c и ћелијска линија здравих хуманих кератиноцита (HaCaT). Ћелије су засејане на медијум за гајење ћелија-Дулбеков медијум са високим садржајем глукозе (DMEM) са додатком 10% феталног говеђег серума (FBS), 2 mM L-

глутамин и 100 U/mL антибиотика стрептомицина и пеницилина и чуване на 37 °C у атмосфери која садржи 5% CO₂.

Процедура

Ћелије фибробласта миша (BALB/c 3T3) су засејане у микроплоче са 96 јамица у густини 3000 ћелија/јамици, док су ћелије кератиноцита (HaCaT) засејане у густини 2000 ћелија по јамици. Након једнодневне инкубације која је неопходна како би се ћелије причврстиле за подлогу, култивисаним ћелијама је додат медијум који садржи растуће концентрације екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis* (10-50 µg/mL). Вијабилност ћелија је испитивана МТТ тестом након 72 сата. МТТ реагенс је добијен растварањем основног раствора МТТ-а (припремљен у PBS-у) у DMEM медијуму и 100 µL раствора је додато у сваку јамицу до постизања коначне концентрације 0,5 mg/mL. Ћелије су потом инкубиране 4 сата на 37 °C, након чега је медијум (супернатант) пажљиво уклоњен, а ћелије и настали кристали МТТ су растворени додатком изопропанола са 0,1 M HCl (100 µL/јамици). Настало плаво/љубичастог обојење потиче од награваног формаза, а његова апсорбанца је измерена на аутоматском анализатору за микроплоче на λ_{max} = 570 nm. Паралелно са пробама које садрже екстракте припремљене су и две контролне групе, прва која подразумева контролу раста ћелије без присуства испитиваних екстракта и контролна група у којој се уместо екстракта додаје истоветна запремина PBS, како би се елиминисао утицај пуфера на раст ћелија. Средња вредност добијена за контролне групе означена је као 100%, а проценат преживелих ћелија изражен је као проценат вијабилних ћелија третираних екстрактима у односу на средњу вредност нетретираних ћелија (контрола):^{349,350}

$$\% \text{ вијабилних ћелија} = \frac{A_{\text{третиране ћелије}}}{A_{\text{контрола}}} \times 100\%$$

4.8. *In vivo* испитивање антиоксидативног потенцијала екстракта

4.8.1. Експерименталне животиње

У оквиру ове докторске дисертације испитиван је протективни ефекат екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis* на оксидативна оштећења изазваног применом високе концентрације цисплатине на нивоу јетре, бубрега и тестиса мужјака лабораторијских пацова соја albino Wistar. Одрасле јединке животиња, тежине 220 ± 20 g, обезбеђене су са Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња Војномедицинске

академије у Београду. Три дана пре реализације експерименталне процедуре, животиње су аклиматизоване у виваријуму Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу у стандардним и контролисаним условима – просечна температура 23 ± 2 °C, влажност ваздуха $50 \pm 15\%$ и циклуси смењивања дана и ноћи (12 h/12 h, осветљење од 08:00-20:00), са целодневним *ad libitum* приступом пелетираној храни и води.

Рад са експерименталним животињама је усклађен са принципима добре лабораторијске праксе одобреним од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама, Факултета медицинских наука у Крагујевцу, као и лабораторијским протоколима Европске уније (86/609/ЕЕС), којима се регулишу експерименти на животињама у научне сврхе.

4.8.2. Експериментални протокол

У експерименталну процедуру испитивања протективних ефеката екстракта на параметре оштећења јетре, бубрега и тестиса укључено је укупно 90 животиња, распоређених произвољно у 18 група, од којих је свака бројала 5 животиња.

Експеримент је подељен у два сегмента у зависности од тога да ли су испитивани екстракти *A. vulgaris* или екстракт *S. hortensis* и спроведен је у току 10 дана.

Експеримент I

Прва група животиња (I) је означена као нормална контрола. Животиње из ове групе имале су слободан приступ пелетираној храни (*per os (p.o.)*, *ad libitum*) и чесменској води. Петог дана експеримента, животињама прве групе интраперитонеално је инјектирано (*i.p.*) 0,5 mL 0,9% раствора натријум-хлорида. Друга група пацова (II) означена је као позитивна контрола. Животиње су нормално узимале храну и воду током 10 дана. Оксидативна оштећења органа су изазвана интраперитонеалном апликацијом (*i.p.*) раствора цисплатине у води (7,5 mg/kg телесне масе животиња (т.м.)) петог дана експеримента. Групе III-V добијале су орално екстракт надземног дела (АН), а групе VI-VIII екстракт корена *A. vulgaris* (АВК) раствореног у води у дозама од 50, 100 и 200 mg/kg телесне масе животиња. Елагинска киселина је примењена као стандардно фенолно једињење које је присутно у оба екстракта. Како елагинска киселина није у потпуности растворљива у води, она је првобитно растворена у веома малој количини 5% DMSO, а потом у води како би се добила доза од 100 mg/kg т.м. којом су третиране животиње у групи IX. Токсичност у групама III-IX изазивана је цисплатином (7,5 mg/kg

т.м.) петог дана експеримента. Као контрола токсичности екстракта надземног дела и корена *A. vulgaris*, групе X и XI су током десет дана примале наведене екстракте у највишој тестираној дози (200 mg/kg т.м.), без изазивања оштећења цисплатином.

Експеримент II

Као и у претходном експерименту, прве две групе животиња су дефинисане као контролне групе. Прва (I) подразумева негативну контролну групу, која је у току десет дана имала приступ води и храни, а петог дана је инјектован (*i.p.*) физиолошки раствор, док је позитивна контрола (II група) третирана цисплатином петог дана експеримента (7,5 mg/kg т.м., *i.p.*). Три групе пацова (III-V) третиране су метанолним екстрактом надземног дела *S. hortensis* (СХН) раствореним у води како би животиње добиле дозу екстракта од 50, 100 и 200 mg/kg т.м., редом. Познати хепатопротективни препарат, силимарин (растворен у води, 100 mg/kg т.м.), на бази биљке млечни чкаљ (*Silybum marianum*), коришћен је као стандардно једињење (VI група). Свим животињама од III до VI групе изазвано је оксидативно оштећење органа петог дана *i.p.* убризгавањем раствора цисплатине (7,5 mg/kg т.м.). Седма група (VII) је означена као *S. hortensis per se* група, а животиње су биле третиране само екстрактом надземног дела *S. hortensis* у највишој примењеној дози (200 mg/kg т.м.) без примене третмана цисплатином, како би се установило да ли сам екстракт испољава негативне ефекте на нивоу ткива.

Након 24 часа од последње примењене дозе екстракта/стандарда (11. дан експеримента), животиње су анестезиране интраперитонеалном апликацијом комбинације кетамина (10 mg/kg) и ксилазина (5 mg/kg), након чега је извршено жртвовање декапитацијом на гиљотини. Узорак крви за припрему крвног серума и анализу биохемијских параметара оксидативног оштећења органа сакупљен је из трупа. Један део јетре, један бубрег и један тестис одвојени су у суд са пуферованим 4% формалдехидом, како би се извршила патохистолошка анализа ткивних исечака.

4.8.3. Припрема серума

Узорак крви сакупљен приликом декапитације животиња остављен је 15 минута на собној температури, након чега су узорци центрифугирани 15 минута на 3000 обртаја. Издвојени супернатант (серум) је распоређен у пластичне вијале од 2 mL, замрзнут и чуван на -80 °C до момента анализе биохемијских параметара органа.

4.8.4. Одређивање функционалних параметара јетре у серуму

4.8.4.1. Одређивање садржаја укупних протеина

Количина протеина у серуму одређивања је стандардном методом са биуретским реагенсом. Реакција је заснована на реакцији комплексирања азота из амидне групе из пептидне везе протеина (-CONH-) са бакром при алкалном рН, при чему се развија љубичасто обојење, чији је интензитет сразмеран количини протеина у серуму (Схема 16).

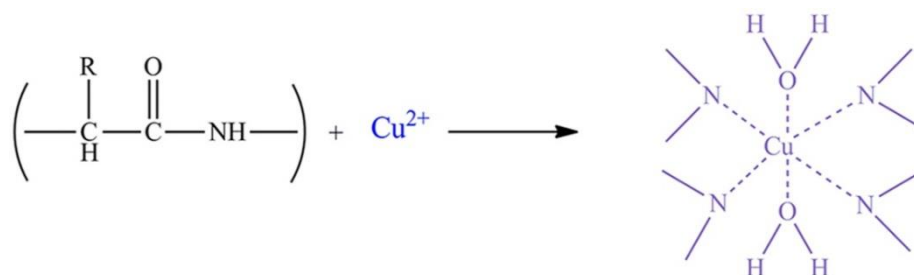


Схема 16. Биуретска реакција

Реагенси

- 1) Биуретски реагенс (Na^+ , K^+ -тартарат, NaOH , CuSO_4 , KI у дестилованој води);
- 2) 0,9% натријум-хлорид;
- 3) Стандардни раствор говеђег албумина из серума (80 g/dm^3);
- 4) Узорак серума експерименталних животиња.

Процедура

У 1 mL биуретског реагенса одмерено је 20 μL узорка серума. Паралелно је припремљена и проба са стандардним раствором албумина, док је као слепа проба коришћен физиолошки раствор (0,9% NaCl). Након тридесетоминутне инкубације на собној температури, мерена је апсорбанца на $\lambda_{\text{max}}=546 \text{ nm}$. Сва спектрофотометријска мерења вршена су на UV-Vis двозрачном спектрофотометру Halo DB-20S (Dynamica GmbH, Швајцарска). Количина укупних протеина у серуму одређена је из израза:

$$\text{Количина укупних протеина } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = \frac{A_{\text{узорка}} - A_{\text{слепа проба}}}{A_{\text{стандарда}}} \times C_{\text{стандарда}}$$

4.8.4.2. Одређивање активности трансаминаза

Трансаминазе се нормално синтетишу у великом броју ћелија, а њихова највећа концентрација се уочава у јетри, док су у мањој количини присутне у скелетним

мишићима и срцу. Активност ovih enzima u serumu se u kliničkoj praksi koristi kao jedan od parametara na osnovu kojih se procenjuje normalna funkcija jetre.

Аспартат трансаминаза (ЕС 2.6.1.1)

Ензим аспартат трансминаза (AST) је трансфераза која катализује реверзибилни пренос α -NH₂ групе са аспарагинске киселине на α -кетоглутарну киселину дајући оксалоацетат и глутамат као производе реакције. Количина насталог оксалоацетата се прати реакцијом редукције у NADH-зависној реакцији, чиме се награђује малат деловањем малат дехидрогеназе (*Схема 17*). Каталитичка активност малат дехидрогеназе прати се као промена апсорбанце NADH и пропорционална је количини оксалоацетата, а он је сразмеран активности аспартат трансминазе. Овај ензим заузима значајно место у метаболизму аминокиселина. Активност аспартат трансминазе испитана је комерцијално доступним дијагностичким сетом Human GmbH (Wiesbaden, Germany).

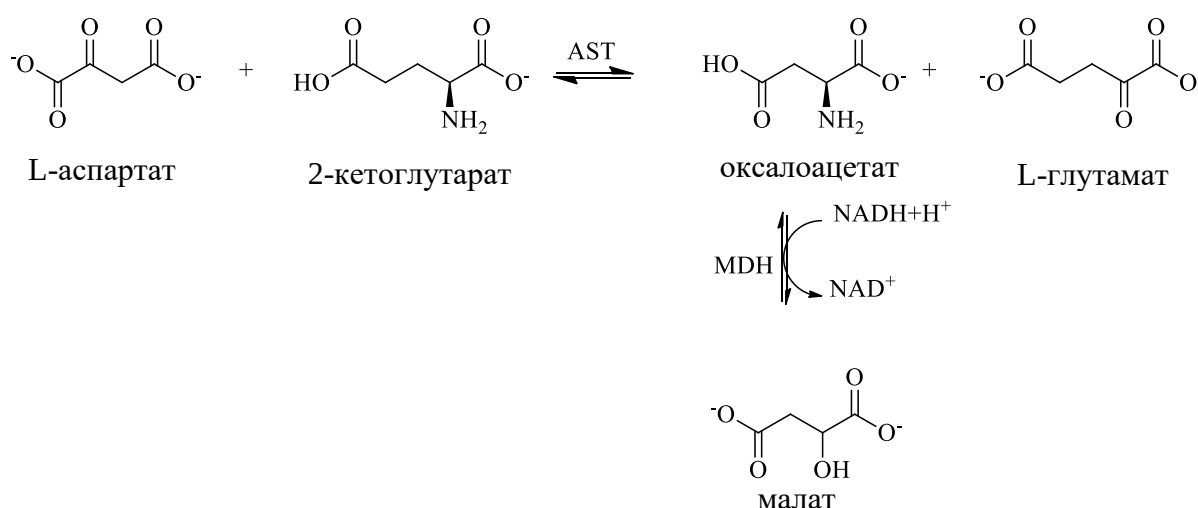


Схема 17. Реакција преноса -NH_2 групе катализована аспартат трансминазом (AST) и куплована реакција редукције оксалоацетата до малата деловањем малат дехидрогеназе (MDH)

Реагенси

- 1) Реагенс I: 100 mmol/L TRIS пуфер, 330 mmol/L L-аспартат, ≥ 2000 U/L лактат дехидрогеназа, ≥ 1000 U/L малат дехидрогеназа и $<0,1\%$ натријум азида;
- 2) Реагенс II: 78 mmol/L α -кетоглутарат, 1,1 mmol/L NADH, $<0,1\%$ натријум азида;
- 3) Серуми експерименталних животиња.

Процедура

Каталитичка активност AST прати се на 37 °C. У кивету за анализу се дода 0,2 mL

реагенса I и 0,05 mL реагенса II и након 25 секунди дода се 0,025 mL серума. Након 50 s, читава се апсорбанца на 340 nm у току 3 минута, после чега се одређује промена апсорбанце у минути и њена средња вредност ($\Delta A/\text{min}$). Активност AST у узорцима серума рачуна се на основу формуле:

$$\text{AST} \left(\frac{\text{U}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 1746$$

Аланин трансаминаза (EC 2.6.1.2)

Аланин трансаминаза (ALT) је трансфераза која катализује реакцију преноса α -амино групе са аланина на кето киселину (α -кетоглутарат), при чему настају L-глутамат и пируват. Активност ALT мери се индиректно, преко количине NADH, који учествује у реакцији редукције пирувата у лактата помоћу лактат дехидрогеназе (Схема 18). Активност аланин трансаминазе испитана је комерцијално доступним дијагностичким сетом Human GmbH (Wiesbaden, Germany).

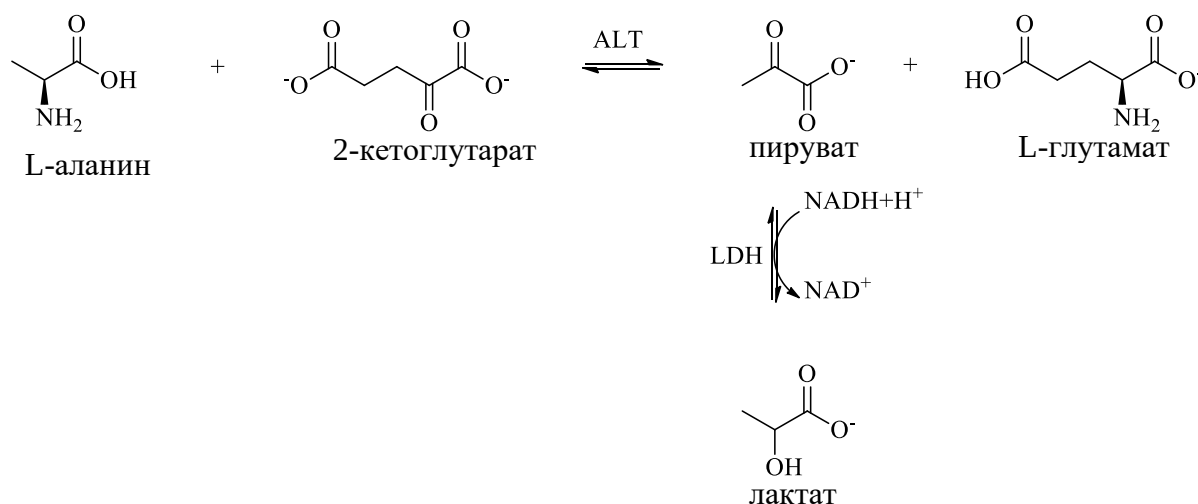


Схема 18. Реакција преноса $-\text{NH}_2$ групе катализована аланин трансаминазом (ALT) и куплована реакција редукције пирувата у лактат деловањем лактат дехидрогеназе (LDH)

Реагенси

- 1) Реагенс I: 125 mmol/L Tris пуфера, 680 mmol/L аланин и ≥ 2000 U/L лактат дехидрогеназе;
- 2) Реагенс II: 97 mmol/L α -кетоглутарат и 1,1 mmol/L NADH;
- 3) Серуми експерименталних животиња.

Процедура

Каталитичка активност ALT прати се на 37 °C. У 0,2 mL реагенса I дода се 0,05

mL реагенса II, а након 25 секунди дода се 0,025 mL серума. Након 50 s, читава се апсорбанца на 340 nm у току 3 минута, након чега се одређује промена апсорбанце у минути и њена средња вредност. Активност ALT у узорцима серума рачуна се на основу формуле:

$$\text{ALT} \left(\frac{\text{U}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 1746$$

4.8.4.3. Одређивање активности гама-глутамил трансферазе (EC 2.3.2.2)

Гама-глутамил трансфераза (GGT) је ензим који катализује пренос γ -глутамил групе са различитих γ -глутамил амида хидролизом до аминокиселина и дипептида (транспептидација) и представља дијагностички маркер хепатичке функције. На *Схеми 19* је представљена реакција коју катализује овај ензим. L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилид је примењен као супстрат (донор), а као акцептор гама-глутамил групе коришћен је глицил-глицин. Као производ ове реакције настају L- γ -глутамил-глицилглицин и 5-амино-2-нитробензоева киселина, чија је количина пропорционална активности GGT и прати се спектрофотометријски на 405 nm. Каталитичка активност овог ензима испитана је комерцијално доступним дијагностичким сетом Human GmbH (Wiesbaden, Germany).

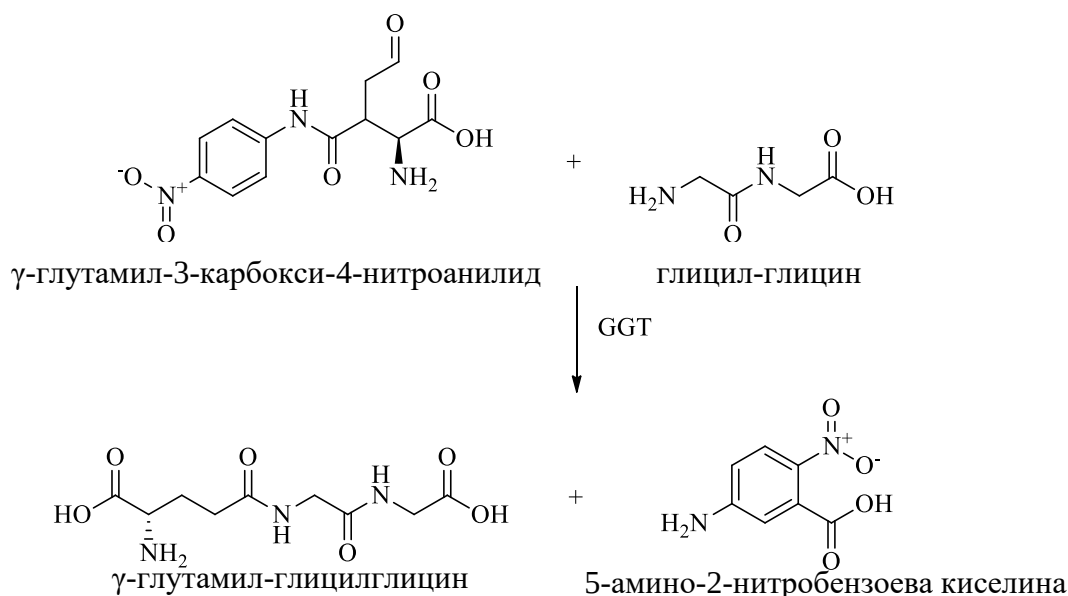


Схема 19. Реакција трансфера γ -глутамил групе на дипепид посредована γ -глутамил трансферазом (GGT)

Реагенси

- 1) Реагенс I: 133 mmol/L Tris пуфер pH 8,25, 138 mmol/L дипептид глицил-глицин;
- 2) Реагенс II: 23 mmol/L амонијумове соли L- γ -глутамил-3-карбокси-4-нитроанилида;

3) Серуми експерименталних животиња.

Процедура

У 0,2 mL реагенса I дода се 0,05 mL реагенса II. После 25 секунди, дода се 0,0125 mL серума, добро промеша и инкубира 50 секунди, након чега се спектрофотометријски на 405 nm прати промена апсорбанције у току 180 секунди, на основу које се одређује промена апсорбанце у минути ($\Delta A/\text{min}$). Реакција се одвија на 37 °C. Активност GGT рачуна се на основу обрасца:

$$\gamma_{\text{GT}} \left(\frac{\text{U}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 2211$$

4.8.4.4. Одређивање активности алкалне фосфатазе (EC 3.1.3.1.)

Алкална фосфатаза (ALP) је ензим који хидролизује естре органских фосфата у базној средини (pH ~10), а као продукти реакције настају слободни фосфат и неки органски алкохол. При патолошким стањима јетре уочава се пораст активности овог ензима у серуму, те стога ALP служи као један од примарних параметара у испитивању функција јетре. При одређивању активности ALP у серуму коришћен је безбојни 4-нитрофенилфосфат као супстрат. Каталитичком активношћу ALP настају жути 4-нитрофенол, чија се концентрација прати спектрофотометријски, и фосфорна киселина (Схема 20). Каталитичка активност овог ензима испитана је комерцијално доступним дијагностичким сетом Human GmbH (Wiesbaden, Germany).

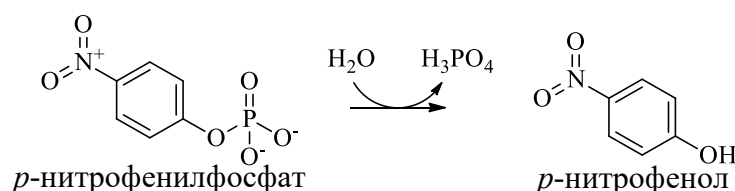


Схема 20. Реакција хидролизе естарске везе каталитичком активношћу алкалне фосфатазе која води ослобађању фосфата и грађењу жуто обојеног производа.

Реагенси

- 1) Реагенс I: 1,25 mol/L диетаноламин пуфер pH 10,2 и 0,625 mmol/L магнезијум хлорид;
- 2) Реагенс II: 50 mmol/L 4-нитрофенилфосфат;
- 3) Серуми експерименталних животиња.

Процедура

Реакција се изводи при температури 37 °C. У 0,25 mL реагенса I дода се 0,06 mL реагенса II, након чега се смеша остави 25 секунди. Потом се овој смеси дода 0,005 mL

серума и након инкубације од 50 секунди, мери се промена апсорбанце у минути и њена средња вредност (у току 100 секунди на 405 nm. Ензимска активност одређена је коришћењем математичког израза:

$$\text{ALP} \left(\frac{\text{U}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta A}{\text{min}} \times 3397$$

4.8.4.5. Одређивање укупног билирубина у серуму

Билирубин представља нормални производ разградње црвених крвних зрнаца и катаболизма хемоглобина који се одиграва у ретикулоендотелним ћелијама слезине. Из хемоглобина, отпуштањем протеинске компоненте и гвожђа, настаје прва жучна боја, биливердин, који се трансформише у билирубин. Настали неконјуговани билирубин, нерастворан у води, путем крви се транспортује везан за албумин до јетре, где се конјугује са глукуронатом дајући као производ конјуговани билирубин. Он се потом излучује у жучну кесу, а из организма се елиминише у облику стеркобилина путем фецеса или уробилина путем урина.³⁵¹

Укупни билирубин, који се лабораторијски одређује у циљу процене стања јетре, подразумева количину и неконјугованог и директног (конјугованог) билирубина. Принцип методе одређивања билирубина заснива се на реакцији диазотоване сулфанилне киселине са билирубином, при чему се награђује азобилирубин, чија је концентрација пропорционална интензитету црвеног обојења који се прати спектрофотометријски на 540 nm (*Схема 21*). Диазотована сулфанилна киселина настаје у реакцији између сулфанилне киселине и натријум-нитрита.

Реагенси

- 1) Реагенс I: 29 mmol/L сулфанилна киселина; 200 mmol/L хлороводонична киселина, 50 mmol/L цетримид;
- 2) Реагенс II: 11,6 mmol/L натријум-нитрит;
- 3) Стандардни раствор билирубина (80 mg/dL);
- 4) Узорци серума експерименталних животиња.

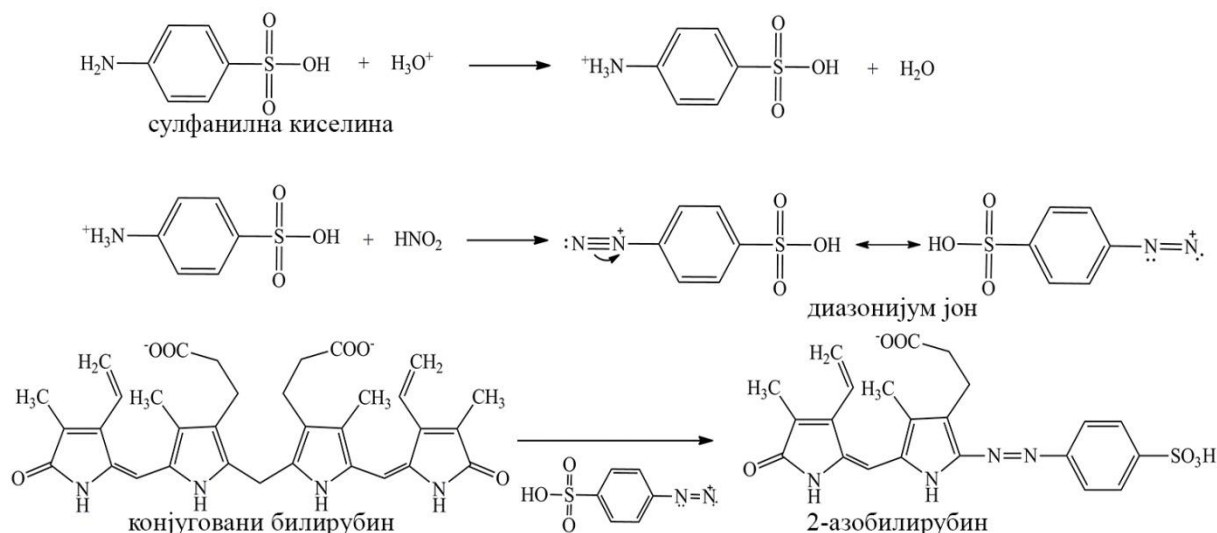


Схема 21. Настајање азобилирубина реакцијом између конјугованог билирубина и диазотоване сулфанилне киселине.³⁵²

Процедура

Радни реагенс раствор припремљен је мешањем 5 mL реагенса I и 1,25 mL реагенса II. У 1,5 mL радног реагенса додато је 0,15 mL узорка серума, након чега је смеша инкубирана 2 минута на 25 °C. Након истека периода инкубације, апсорбанца насталог обојења праћена је на 540 nm. Паралелно је припремљена и проба са стандардним раствором билирубина познате концентрације, као и слепа проба узорка, која садржи реагенс I уместо радног реагенса и узорак. Концентрација укупног билирубина у серуму израчунава се на основу формуле:

$$C_{\text{укупног билирубина}} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{A_{\text{узорка}} - A_{\text{слепа проба узорка}}}{A_{\text{стандарда}}} \times C_{\text{стандарда}} \times 17,1$$

4.8.5. Одређивање параметара оштећења бубрега у серуму

4.8.5.1. Одређивање концентрације мокраћне киселине

Мокраћна киселина представља продукт катаболизма аденина и гуанина, пуринских база, код човека, примата и птица. Будући да је мокраћна киселина слабо растворна у воденој средини, примећено је да постоји могућност њеног таложења у дисталним каналићима бубрега, чиме се директно утиче на реналну функцију. Принцип одређивања мокраћне киселине у серуму заснива се на реакцији оксидације мокраћне киселине до алантоина, CO₂ и H₂O₂, која је катализована уриказом. Концентрација

мокраћне киселине се мери преко количине насталог водоник-пероксида. Наиме, настали водоник-пероксид реагује са 3,5-дихлоро-2-хидроксибензен сулфонском киселином и 4-аминофеназоном у присуству пероксидазе, при чему настаје црвено обојени комплекс (Схема 22). Мокраћна киселина је у серуму експерименталних животиња одређена коришћењем комерцијалног дијагностичког сета BioSystems (BioSystems S.A., Барселона, Шпанија), а мерење је вршено на аутоматском анализатору Roche Cobas® Mira (Roche Diagnostic Ltd, Роткројц, Швајцарска).

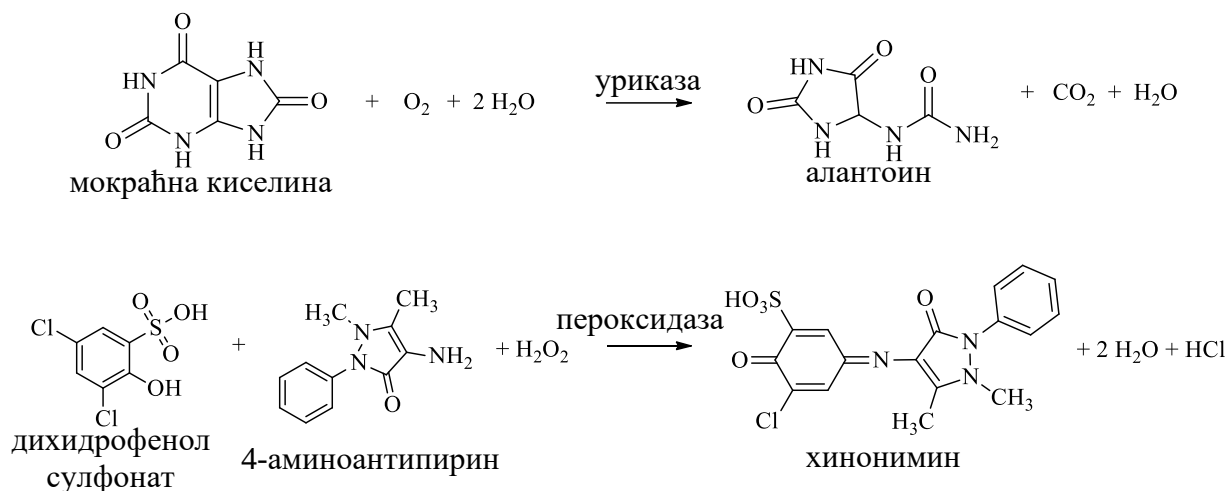


Схема 22. Купловане реакције одређивања мокраћне киселине у серуму

Реагенси

- 1) Реагенс: 4 mmol/L 3,5-дихлоро-2-фенол сулфонат, 0,5 mmol/L 4-аминофеназон, 100 mmol/L фосфат, 1,5 g/L детергент, > 0,12 U/mL уриказа, > 1 U/mL пероксидаза, > 5 U/mL аскорбат оксидаза;
- 2) Стандардни раствор мокраћне киселине (60 mg/L);
- 3) Серуми експерименталних животиња.

Процедура

У 1,5 mL реагенса дода се 37,5 μ L узорка серума/стандарда и смеша инкубира на 37 °C у току 5 минута. Паралелно са узорцима припремљена је и слепа проба, која садржи дестиловану воду уместо узорка. Након истека периода инкубације, апсорбанца је мерена на $\lambda_{\text{max}} = 520$ nm, а концентрација мокраћне киселине у серуму израчуната је на основу обрасца:

$$C_{\text{мокраћне киселине}} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{A_{\text{узорка}}}{A_{\text{стандарда}}} \times C_{\text{стандарда}} \times 357$$

4.8.5.2. Одређивање количине урее

Уреа представља крајњи производ метаболизма аминокиселина и протеина у организму. Принцип одређивања урее у серуму заснива се на куплованим реакцијама разградње урее до амонијака (катализована уреазом) и реакције насталог амонијака са α -кетоглутаратом, која је катализована глутамат дехидрогеназом (Схема 23). У овој реакцији долази до оксидације коензима NADH у NAD⁺. Количина урее у узорку је пропорционална смањењу количине редукваног NADH, што се прати спектрофотометријски. Уреа је у серуму експерименталних животиња одређена коришћењем комерцијалног дијагностичког сета BioSystems (BioSystems S.A., Барселона, Шпанија), а мерење је вршено на аутоматском анализатору Roche Cobas® Mira (Roche Diagnostic Ltd, Роткројц, Швајцарска).

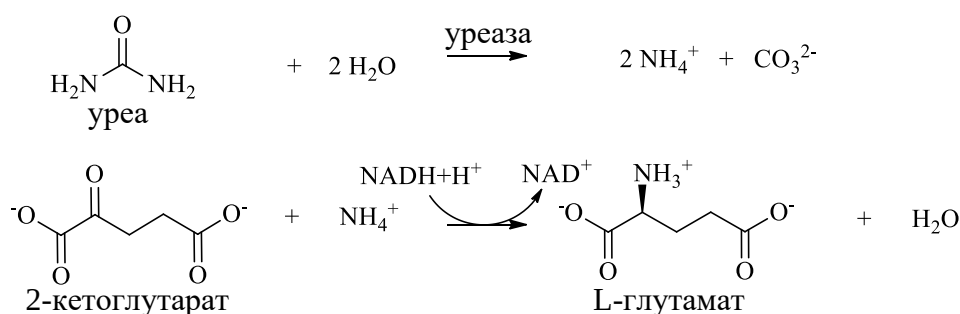


Схема 23. Купловане реакције одређивања урее у серуму.

Реагенси

- 1) Реагенс I: > 140 U/mL уреазе, > 140 U/mL глутамат дехидрогеназа, 100 mmol/L TRIS-пуфер, 5,6 mmol/L α -кетоглутарат, 220 g/L етиленгликол, 0,95 g/L натријум азид;
- 2) Реагенс II: 1,5 mmol/L NADH, 9,5 g/L натријум азид;
- 3) Стандардни раствор урее: 8,3 mmol/L уреа, 100 mg/dL глукоза и креатинин 2 mg/dL;
- 4) Серуми експерименталних животиња.

Процедура

Први корак у одређивању урее подразумева прављење радног раствора (4 mL реагенса I и 1 mL реагенса II). У 1,5 mL радног раствора реагенса дода се 10 μ L узорка/стандарда и апсорбанца узорка се мери након 30 и 90 секунди на $\lambda_{\text{max}}=340 \text{ nm}$, при температури од 37 °C. Концентрација урее у серуму рачуна се на основу израза:

$$C_{\text{уреа}} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) = \frac{(A_{30s} - A_{90s})_{\text{узорка}}}{(A_{30s} - A_{90s})_{\text{стандарда}}} \times 8,3$$

4.8.5.3. Одређивање концентрација креатинина

Креатинин је органско једињење које настаје разградњом креатина и фосфокреатина. Већина креатинина ствара се у мишићима, а како се његова екскреција одиграва преко бубрега, његова концентрација у серуму, плазми и урину представља параметар брзине гломеруларне филтрације. У серуму експерименталних животиња, креатинин је одређен применом методе засноване на реакцији грађења црвено обојеног Јановски комплекса између креатинина и пикринске киселине у базној средини (Схема 24), коришћењем комерцијалног дијагностичког сета BioSystems (BioSystems S.A., Барселона, Шпанија), а мерење је вршено на аутоматском анализатору Roche Cobas® Mira (Roche Diagnostic Ltd, Роткројц, Швајцарска).

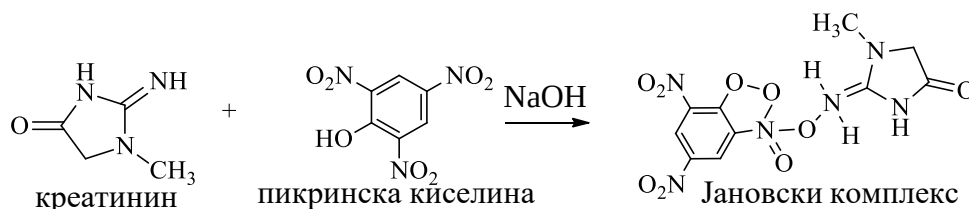


Схема 24. Формирање црвено обојеног Јановски комплекса у базној средини реакцијом између креатинина и пикринске киселине.

Реагенси

- 1) Реагенс I: 0,4 mol/L NaOH и детерџент;
- 2) Реагенс II: 25 mmol/L пикринска киселина;
- 3) Стандардни раствор креатинина: 177 $\mu\text{mol/L}$ креатинина, 50 mg/dL уреа, 100 mg/dL глукоза.
- 4) Серуми експерименталних животиња.

Процедура

Први корак у одређивању концентрације креатинина је припрема радног реагенс раствора, који се добија мешањем реагенаса I и II у једнаким односима. Уређај је темпериран на 37 °C. У 1 mL радног раствора додаје се 10 μL узорка/стандарда, а апсорбанца насталог црвено-наранџастог комплекса се мери након 30 и 90 секунди на $\lambda_{\text{max}}=520 \text{ nm}$, а на основу следећег израза одређује се концентрација креатинина у серуму:

$$\text{концентрација креатинина } \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right) = \left(\frac{(A_{30s} - A_{90s})_{\text{узорка}}}{(A_{30s} - A_{90s})_{\text{стандарда}}} \times 177 \right) - 33$$

4.8.6. Одређивање функционалних параметара тестиса у серуму

4.8.6.1. Одређивање концентрације тестостерона

Тестостерон представља главни мушки полни хормон, чија се биосинтеза одиграва у тестисима. Одређивање његове концентрације у серуму вршено је електрохемилуминисцентном методом (ECLIA) на аутоматизованом анализатору Roche Cobas® Mira (Roche Diagnostic Ltd, Роткројц, Швајцарска), коришћењем комерцијално доступног теста Elecsys (Elecsys Diagnostics, Roche Diagnostic Ltd, Роткројц, Швајцарска). Принцип одређивања тестостерона овом методом базира се на конкуритивном тесту везивања за полистиренске сфере које садрже моноклонална антитела. Тестостерон се из узорка серума ослобађа додатком 2-бром естрадиола и „такмичи“ се са дериватом тестостерона обележеног рутенијум комплексом за место на антителу, који је обложен биотином.

Реагенси

- 1) 0,72 mg/mL стрептавидин-обложене микропартикуле;
- 2) Реагенс I: 40 ng/mL биотиниловано овчије моноклонално анти-тестостерон антитело, 2-бром естрадиол, 50 mM MES пуфера (pH 6,0);
- 3) Реагенс II: 1,5 ng/mL дериват тестостерона у комплексу са рутенијумом, 100 mM MES пуфера (pH 6,0);
- 4) Узорци серума експерименталних животиња.

Процедура

Конкуритивни имуноесеј за одређивање тестостерона започиње инкубацијом 20 µL серума са реагенсом I, након чега се додају микропартикуле стрептавидина и реагенса II. Међусобном интеракцијом реагенса I и стрептавидина долази до везивања насталог имуног комплекса за чврсту фазу. Добијена реакциона смеша се потом аспирира у мерну ћелију, где под утицајем магнетног поља долази до облагања површине електроде микропартикулама, што узрокује напон на електроди који доводи до појаве хемилуминисцентне емисије на 640 nm. Мерење интензитета овог зрачења мери се фотомултипликатором, након чега се концентрација тестостерона аутоматски израчунава преко калибрационе криве за тестостерон.

4.9. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткивима

4.9.1. Припрема хомогената

Део јетре, по један тестис и бубрег хомогенизовани су са PBS (енг. *Phosphate buffered saline*) фосфатним пуфером (pH 7,4) помоћу Potter-овог хомогенизатора у односу 1:10 (маса ткива:запремина растварача), како би се добили 10% хомогенати органа. Хомогенати су потом центрифугирани на $8717 \times g$ на $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ у току 10 минута, након чега је супернатант распоређен у пластичне вијале и чуван на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализе. Степен оксидативног оштећења ткива спроведен је праћењем ензимских (супероксид дисмутаза и каталаза) и неензимских маркера оксидативног стања органа (редуковани глутатион и ниво супстанци које реагују са тиобарбитурном киселином).

4.9.2. Одређивање количине укупних протеина

За одређивање количине укупних протеина у хомогенатима примењена је метода по Лорију.³⁵³ Ова метода је заснована на реакцији између бакра (II) и пептидних веза протеина у базној средини, услед чега долази до редукције бакра (II) до бакра (I). Након тога се у смешу додаје Фолин-Чокалтеов раствор, који реагује са багром из комплекса бакар (I)-протеин, као и бочним остацима ароматичних аминокиселина (тирозин, триптофан) и цистеина узрокујући оксидацију бакра и појаву плаве боје раствора.

Реагенси

- 1) Реагенс I: 2% раствор Na_2CO_3 у 0,1 М NaOH;
- 2) Реагенс II: 0.5% раствор CuSO_4 у 1% K, Na-тартарату;
- 3) Реагенс III: помешати реагенс I и реагенс II у односу 1:20;
- 3) 1 М Фолин-Чокалтеов реагенс;
- 4) Хомогенати ткива експерименталних животиња;
- 5) Стандардни раствор говеђег серум албумина (80 g/dL).

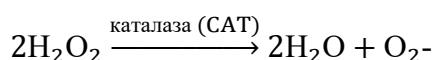
Процедура

У 2 mL реагенса III дода се 200 μL хомогената, након чега се смеша инкубира десет минута на собној температури. После истека реакционог времена, смеша се додаје 200 μL Фолин-Чокалтеовог реагенса, након чега се смеша инкубира пола сата. Паралелно је припремљена и серија раствора говеђег серум албумина у опсегу концентрација од 0,05

до 1 mg/mL. Апсорбанца узорка/стандардног раствора албумина је очитавана на 750 nm, а концентрација протеина у узорку израчуната је из нагиба калибрационе криве добијене за говеђи серум албумин.

4.9.3. Одређивање активности каталазе

Каталаза ($\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ -оксидоредуктаза, ЕС 1.11.1.6) је ензим који припада групи оксидоредуктаза и широко је распрострањен у многим организмима. Примарна улога овог ензима је у реакцији разградње водоник пероксида до воде и кисеоника, у којој се један молекул водоник пероксида понаша као донор, а други као акцептор електрона:



Активност каталазе одређује се по методи³⁵⁴ заснованој на праћењу смањења количине водоник пероксида.

Реагенси

- 1) 0,05 М фосфатни пуфер, рН 7,0;
- 2) 0,036% водоник пероксид у 0,05 М фосфатном пуферу рН 7,0;
- 3) Хомогенати јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња.

Процедура

Температуру спектрофотометра (Halo DB-20S, Dynamica GmbH, Швајцарска) је потребно подесити да буде 25 °C. Пре почетка експеримента неопходно је разблажити раствор водоник пероксида да његова апсорбанца на 240 nm буде између 0,525 и 0,55. Затим је потребно проверити која количина узорка доводи до промене апсорбанце у минути од 0,03 до 0,06. Након тога, у кварцну кивету се дода редом 2,9 mL водоник пероксида и установљена количина узорка (100 μl), након чега се прати смањење апсорбанце водоник пероксида услед разлагања на $\lambda_{\text{max}}=240 \text{ nm}$ у току 3 минута на сваких 10 секунди. Активност каталазе изражава се у ензимским јединицама (U) по милиграму укупних протеина (U/mg). Једна јединица каталазе (U) разграђује 1 μmol водоник пероксида у минути. Активност ензима израчуната је на основу формуле:

$$\text{CAT} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{3,45 \times \left(\frac{V_{\text{укупно}}}{V_{\text{хомогената}}} \right)}{\Delta T \times 0,1}$$

Где ΔT представља време у минутима за које се апсорбанца смањи од 0,45 до 0,40. У циљу одређивања активности CAT у 1 L узорка, добијена вредност се уврштава у формулу:

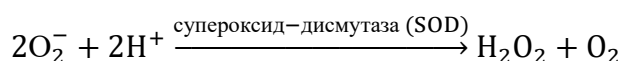
$$\text{CAT} \left(\frac{\text{U}}{\text{L}} \right) = \text{CAT} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) \times 1000$$

Каталитичка активност CAT изражена у интернационалним јединицама (U) по 1 mg протеина у хомогенату добија се из формуле:

$$\text{CAT} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg протеина}} \right) = \frac{\text{CAT} \left(\frac{\text{U}}{\text{L}} \right)}{C_{\text{протеина}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}$$

4.9.4. Одређивање активности супероксид дисмутазе

Супероксид дисмутаза (супероксид:супероксид оксидоредуктаза; EC 1.15.1.1; SOD) је ензим који катализује реакцију диспропорционисања супероксидног анјона на водоник пероксид и кисеоник. Активност SOD се одређује методом базираном на способности ензима да спречи аутооксидацију епинефрина у адренохром у условима базне рН вредности.³⁵⁵ Услов за одигравање реакције аутооксидације епинефрина је постојање супероксидног анјона који катализује ову реакцију.



Сходно томе, уклањањем O_2^- каталитичком активношћу SOD, онемогућава се одигравање реакције аутооксидације адреналина.

Реагенси

- 1) 0,02 M HCl;
- 2) 0,05 M карбонатни пуфер, рН 10,20 до 10,25 са $1,00 \times 10^{-4}$ M ЕДТА;
- 3) 0,01 M епинефрин у 0,020 M HCl;
- 4) Хомогенати јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња.

Процедура

На самом почетку рада неопходно је одредити V_0 , тј. ону запремину адреналина која ће бити коришћена у току експеримента. У кивету се одмери 0,925 mL карбонатног пуфера и 50 μL PBS-а. Овим раствором се подешава нула на спектрофотометру. Након тога, додаје се 25 μL раствора адреналина, и одмах се почиње са бележењем апсорбанце на $\lambda_{\text{max}}=485$ nm на сваких 10 секунди у току 5 минута. Када се заврши са читавањем, конструише се крива зависности апсорбанце од времена, на основу које се одређује нагиб ($\Delta A/\text{min}$) на линеарном делу криве, који треба да буде у $0,025 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$. Ова промена апсорбанце у минути је изабрана на основу чињенице да SOD тада испољава највиши

проценат инхибиције аутооксидације епинефрина. Примењена количина адреналина представља V_0 . Уколико се догоди да вредности нагиба одступају од наведене вредности за $\Delta A/\text{min}$, потребно је разблажити раствор епинефрина.

Даља процедура подразумева одређивање запремине узорка који је потребно додати (V_{SOD}). У кивету се одмери 0,925 mL карбонатног пуфера и 50 μL хомогената и овим раствором се подеси нула на апарату. Након тога се дода утврђена запремина раствора епинефрина (V_0). Реакциона смеша се измеша и почиње се са бележењем апсорбанце на $\lambda_{\text{max}}=485 \text{ nm}$ на сваких 10 секунди у току 5 минута. За одређивање промене апсорбанце у минути ($\Delta A/\text{min}$) примењује се временски интервал који је коришћен за израчунавање $\Delta A/\text{min}$ приликом одређивања V_0 . Вредност $\Delta A/\text{min}$ која се добије представља V_{SOD} .

Релативна јединица активности SOD је дефинисана као она активност која доводи до 50% инхибиције аутооксидације епинефрина под специфичним условима и израчунава се на основу математичког израза:

$$\text{SOD} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{V_0 - V_{\text{SOD}}}{\frac{V_0}{2}}$$

Како би се одредила активност SOD у 1 L узорка, добијена вредност се уврштава у формулу:

$$\text{релативна активност SOD} \left(\frac{\text{U}}{\text{L}} \right) = \text{SOD} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) \times \frac{V_{\text{укупна запремина}}}{V_{\text{хомогената}}} \times 1000$$

Каталитичка активност SOD изражена у интернационалним јединицама (U) по 1 mg протеина у хомогенату добија се из формуле

$$\text{SOD} \left(\frac{\text{U}}{\text{mg протеина}} \right) = \frac{\text{SOD} \left(\frac{\text{U}}{\text{L}} \right)}{c_{\text{протеина}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}$$

4.9.5. Одређивање количине редукованог глутатиона

Глутатион (γ -глутамил-цистеинилглицин) је трипептид који представља један од најзначајних чинилаца антиоксидативне одбране организма. У редукованом облику (GSH) слободне тиолне групе цистеина могу да донирају протон или електрон слободном радикалу, чиме се он неутралише.

Количина GSH у хомогенатима се лабораторијски одређује Ellman-овим тестом³⁵⁶, базираним на реакцији 2,2'-динитро-5,5'-дитиодибензоеве киселине (DTNB) са алифатичним тиолним једињењима у базној средини (pH 9,0) (Схема 25). На овај начин

настаје један мол *p*-нитрофенол анјона (TNB²⁻) по једном молеку тиола, који је у алкалној средини јако жуто обојен, те се интензитет овог обојења прати спектрофотометријски на 412 nm.

Реагенси

- 1) 0,2 mol/L K₂HPO₄ са 2 mmol/L EDTA pH 9,0;
- 2) 10 mmol/L DTNB (2,2'-динитро-5,5'-дитио-добензоева киселина), растворен у 50 mmol/L фосфатном пуферу pH 7,0;
- 3) Стандардни раствор глутатиона (100 mg/mL);
- 3) Хомогенати јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња.

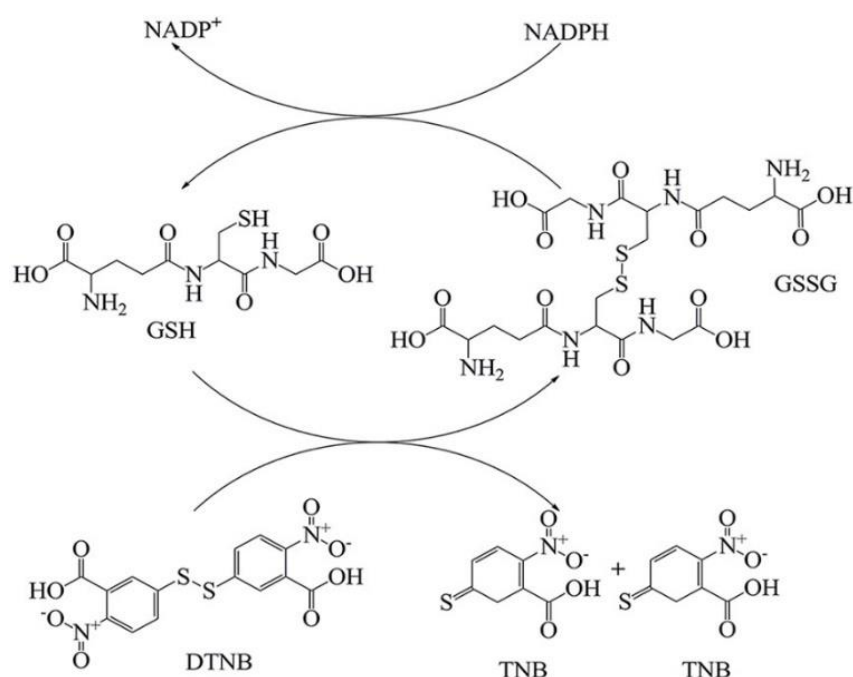


Схема 25. Оксидација редукованог облика глутатиона (GSH) до оксидоване форме (GSSG) у присуству DTNB

Процедура

У 900 μ L раствора калијум-хидрогенфосфата додато је 50 μ L узорка и 20 μ L DTNB реагенса. Кивете су потом инкубиране у мраку на 25 °C у току 25 минута, након чега је прочитана апсорбанца на $\lambda_{\text{max}}=412$ nm у односу на слепу пробу (фосфатни пуфер (PBS) уместо узорка). Паралелно са узорцима припремљена је и серија разблажења концентрованог стандардног раствора глутатиона (0-100 mg/mL).

На основу вредности добијених за стандардни раствор глутатиона, конструисана је крива зависности апсорбанце прочитане на 412 nm и концентрације стандардног раствора

глутатиона. Нагиб праве представља концентрацију глутатиона изражену у милиграмима по литру (mg/L):

$$\text{GSH} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = A_{\text{узорка}} \times \frac{V_{\text{укупно}}}{V_{\text{хомогената}}} \times 1000$$

Садржај GSH у хомогенатима је изражен је у милиграмима GSH по 1 граму протеина.

$$\text{GSH} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g протеина}} \right) = \frac{\text{GSH} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{c_{\text{протеина}} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right)}$$

4.9.6. Одређивање степена липидне пероксидације у ткиву на основу количине супстанци које реагују са тиобарбитурном киселином (TBARS)

Један од најзначајних биомаркера оксидативног стреса у живим организмима је малонилдиалдехид (MDA), један од крајњих продуката пероксидације виших масних киселина и деградације нестабилних липидних пероксида. Ово једињење гради ружичасто обојени комплекс са тиобарбитурном киселином (ТБА) који показује максимум апсорпције на 532 nm (Схема 26). Очитана вредност је пропорционална количини једињења која реагују са тиобарбитурном киселином, а изражена је преко количине малонилдиалдехида.³⁵⁷

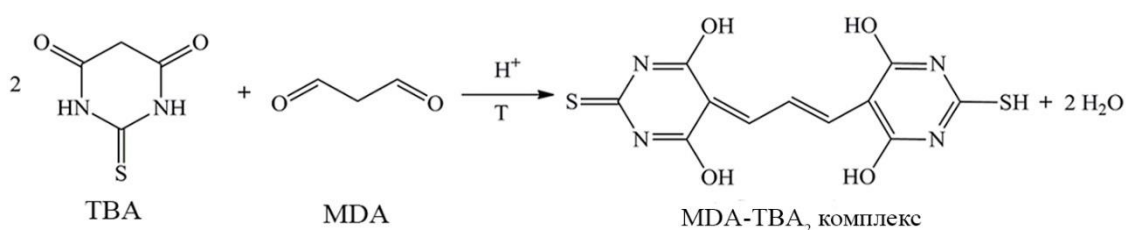


Схема 26. Формирање ружичасто обојеног комплекса MDA-TBA₂ у реакцији између тиобарбитурне киселине (ТБА) и малонилдиалдехида (MDA)

Реагенси:

- 1) 8,1% детергента (натријум додецил сулфата, SDS);
- 2) 20% сирћетна киселина, pH 3,5;
- 3) 0,8% тиобарбитурна киселина (ТБА), растворена у 0,5 М NaOH;
- 4) 1 mmol/L раствор стандарда 1,1,3,3-тетраетоксипропана (MDA);
- 5) Хомогенати јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња.

Процедура

У 100 μL узорка додато је 200 μL раствора SDS, 1,5 mL сирћетне киселине, 1,5 mL раствора ТВА и 700 μL дестиловане воде, након чега су епрувете загреване сат времена на 95 $^{\circ}\text{C}$. По истеку реакционог времена, узорци су пренети у кивете за центрифугирање и центрифугирани на 5000 обртаја 10 минута, како би се одвојили протеини, након чега је мерена апсорбанца насталог розе комплекса на $\lambda_{\text{max}}=535 \text{ nm}$. Упоредо са узорком припремане су и пробе са серијом разблажења основног раствора MDA у распону концентрација 1-10 $\mu\text{mol/L}$, на основу којих је конструисана калибрациона крива. Нагиб праве представља концентрацију MDA изражену у $\mu\text{mol/L}$.

Концентрација MDA у испитиваним узорцима изражена је у nmol MDA по 1 mg укупних протеина у хомогенату на основу израза

$$\text{TBARS} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg протеина}} \right) = \frac{\text{MDA} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{L}} \right)}{C_{\text{протеина}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}$$

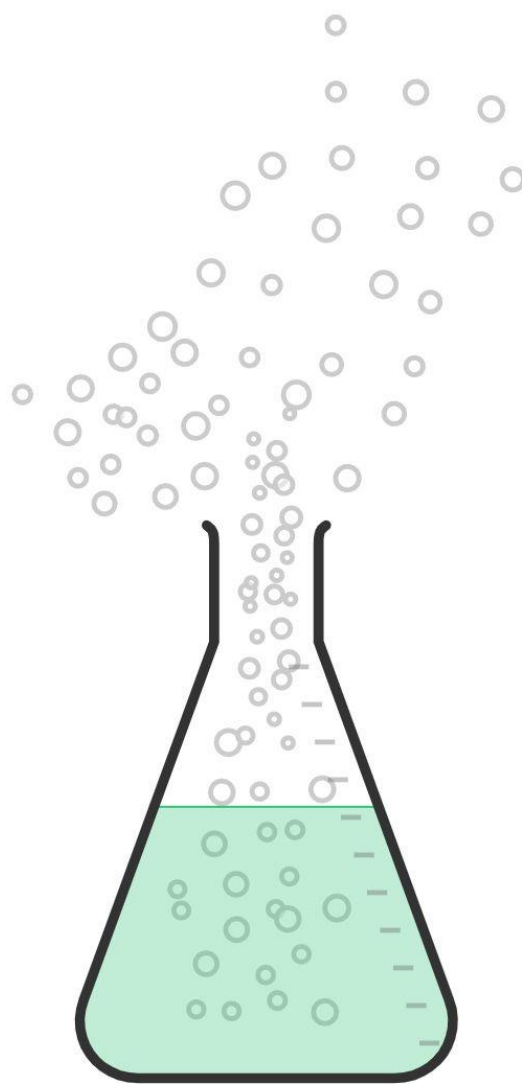
4.10. Хистоморфолошка и патолошка анализа исечака јетре, бубрега и тестиса

Као што је већ споменуто, један део ткива јетре, бубрега и тестиса је након декапитације пребачен у фиксатив (пуферисани 4% формалдехид (pH 7,4)) како би се спречио процес аутолизе и задржала анатомија ткива након његове изолације, а са циљем да се процени утицај тестираних екстраката на морфолошке промене у ткивима. Након целодневне фиксације, примењена је стандардна процедура припреме ткива за бојење, која подразумева пребацивање ткива из парафина у растворе алкохола растуће концентрације и ксилола, након чега се калупе у парафин. Тако припремљени узорци су потом сечени на микротому. Како би се извршио процес бојења ткивних исечака, узорци су третирани ксилолом, у циљу депарафинисања, а потом етанолом опадајуће концентрације у циљу рехидратације, након чега се исечци боје хистолошким бојама, базном бојом, хематоксилином (који боји једра) и киселом, еозином (боји цитоплазму). По завршетку процеса бојења, на осушене узорке је нанет слој синтетске смоле и покровно стакалце. Визуализација морфолошких промена спроведена је на светлосном микроскопу, а фотографије слајдова посматраних под микроскопом направљене су при увећању од 100 пута.

4.11. Статистичка обрада података

Резултати добијени у оквиру ове дисертације анализирани су путем софтвера за обраду експерименталних података SPSS 10.0 верзија за Windows оперативни систем. Аритметичка средина резултата добијених приликом три мерења (осим уколико није другачије назначено), односно промена на нивоу групе када је реч о *in vivo* експериментима коришћена је као мера централне тенденције појединачне групе. Стандардна грешка мерења за *in vivo* експерименте, односно стандардна девијација за експерименте спроведене у *in vitro* условима коришћена је као мера варијабилности између тестираних узорака. Нормалност у расподели узорака одређена је Shapiro-Wilk-овим тестом за *in vitro* експерименте, док су резултати Kolmogorov-Smirnov теста посматрани приликом анализирања резултата студија спроведених у *in vivo* условима. Величина варијабилности испитивана је једнофакторијалном униваријационом анализом варијансе (One-way ANOVA), а упоређивање просечних вредности између различитих узорака одређено је у *post hoc* анализи применом Tukey теста и Фишеровим тестом најмање значајне разлике (Fisher Least Significance Difference).

5. Резултати и дискусија



5.1. Фенолни профил екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis*

Квалитативна анализа и квантификација фенолних једињења присутних у метанолним екстрактима *A. vulgaris* и *S. hortensis* извршена је применом тандем масене спектрометрије (троструки квадрупол; QQQ) купловане са хроматографијом високих перформанси (UHPLC) уз ултраљубичасти детектор са низом диода (DAD). Раздвајање и идентификација фенолних компонената у екстрактима *A. vulgaris* и *S. hortensis* изведени су применом бинарне мобилне фазе састављене од закишељене воде и ацетонитрила. Додавање адитива, попут ацетатне, мравље или, ређе, неке друге киселине доводи до сузбијања дисоцијације фенолних и карбоксилних група, што у значајној мери доприноси облику и бољем изгледу пикова на хроматограму.

На основу поређења са ретенционим временима, UV-Vis и MS спектрима референтних једињења, у испитиваним екстрактима је одређено укупно 28 компонената које припадају полифенолима. Поред фенолних киселина, које укључују деривате и хидроксициметне и хидроксибензојеве киселине, у испитиваним екстрактима идентификована су и једињења која припадају флавоноидима: флаван-3-оли, флавони, флаванони, флавоноли и халкони, као и једињења која припадају класама стилбена и кумарина.

Када је реч о екстракту надземног дела *A. vulgaris*, хроматографском анализом и поређењем са масеним спектрима добијеним за стандардна једињења, потврђено је присуство 23 фенолне компоненте (Табела 8). Добијени хроматограм приказан је на Слици 24. Узимајући у обзир комплексност хемијског профила екстракта *A. vulgaris*, потенцијални проблем немогућности идентификовања супстанци истог m/z односа и њиховог чистог раздвајања превазиђен је применом мода праћења појединачних компонената (SRM) (Слика 25). Увидом у добијене резултате уочава се да се у хемијском профилу надземног дела вирка доминирају флаван-3-оли и деривати бензојеве киселине. Иако су у овом екстракту идентификовани и флавоноли и њихови деривати, као и деривати хидроксициметне киселине, флавоноли, флаванони и бициклични флавоноиди, њихова количина је неупоредиво мања у односу на најзаступљеније групе једињења. Резултати хроматографске анализе показују да се у квантитативном погледу највише издваја једињење (пик број 11а на UHPLC SRM хроматограму) чији су псеудомолекуларни јони $[M-H]^-$ у негативном моду на m/z 301, и јонски фрагменти на m/z 149 и 229, што одговара елагинској киселини (на основу поређења са стандардним

једињењем), чија је концентрација у АВН била 1461,53 $\mu\text{g/g}$ екстракта. Друга по реду најзаступљенија компонента надземног дела вирка је флаван-3-ол катехин (пик **3a**; 1074,32 $\mu\text{g/g}$). Масеном фрагментацијом псеудомолекулског јона $[\text{M-H}]^-$ у негативном моду на m/z 289 добијена су два фрагмента на m/z 205 и 245, што је у сагласности са масеним спектром катехина. Поред ова два једињења, у надземном делу вирка је у великој количини присутан и естар катехина и галне киселине, катехин-3-*O*-галат (**15a**; 694,40 $\mu\text{g/g}$). Ово једињење показује прекурсор јон $[\text{M-H}]^-$ на m/z 441 и главни фрагмент на m/z 169, што указује на отпуштање галоил групе, док се други фрагмент јавља на m/z 368, што одговара катехину.

У екстракту надземног дела вирка идентификовани су и флавоноли и њихови гликозидни деривати, међу којима је најзаступљенији изокверцитрин (**13a**; 183,74 $\mu\text{g/g}$), који се јавља на 4,02 min. Структурно, изокверцитрин представља 3-*O*- β -глукозид кверцетина, са карактеристичним јоном $[\text{M-H}]^-$ m/z 463 у негативном моду. Масени фрагменти се јављају на m/z 300 и 243. Пикови **16a** и **17a** јављају се на ретенционом времену 4,39 односно 4,40 min и показују исти прекурсорни јон $[\text{M-H}]^-$ у негативном моду на m/z 447. Након фрагментације, једињење **16a** показује масене фрагменте на m/z 255 и 284, док су за једињење **17a** MS^2 фрагменти на m/z 201 и 300. На основу поређења са стандардним једињењима, једињење **16a** означено је као астрагалин (кемферол-3-*O*-глукозид), а количина ових гликозида у надземном делу вирка је приметно нижа у односу на претходно поменути изокверцитрин (96,97 и 3,85 $\mu\text{g/g}$). Агликон изокверцитрина и кверцитрина, кверцетин (**21a**), појављује се на 5,46 min са $[\text{M-H}]^-$ на m/z 301 и у количини од 20,133 $\mu\text{g/g}$. Последњи пик идентификован је као кемферол (**24a**) и његова количина у екстракту АВН је скоро дупло мања у односу на кверцетин – 11,75 $\mu\text{g/g}$.

Фенолне киселине у екстракту АВН присутне су у облику деривата хидроксибензоеве и хидроксициметне киселине. Када је реч о бензоевим киселинама, поред већ поменуте елагинске киселине, у екстракту АВН идентификоване су још и *p*-хидроксибензоева киселина (**2**; 89,61 $\mu\text{g/g}$) и сиригична киселина (**6a**; 1,91 $\mu\text{g/g}$). На основу поређења са масеним спектрима стандардних једињења, у АВН је доказано присуство хлорогенске (**1a**), кафеинске (**5a**), *p*-кумарне (**7a**), ферулне (**8a**), синапинске (**9a**) и рузмаринске киселине (**14a**). Међутим, њихова укупна количина је знатно нижа у односу на друге класе једињења (од 0,89 $\mu\text{g/g}$ за **9a** до 42,19 $\mu\text{g/g}$ у случају **7a**).

У веома малој количини, готово у траговима, у АВН су идентификовани флаванон нарингенин (**22a**) и његов гликозидни дериват нарингенин-7-*O*-неохесперозид

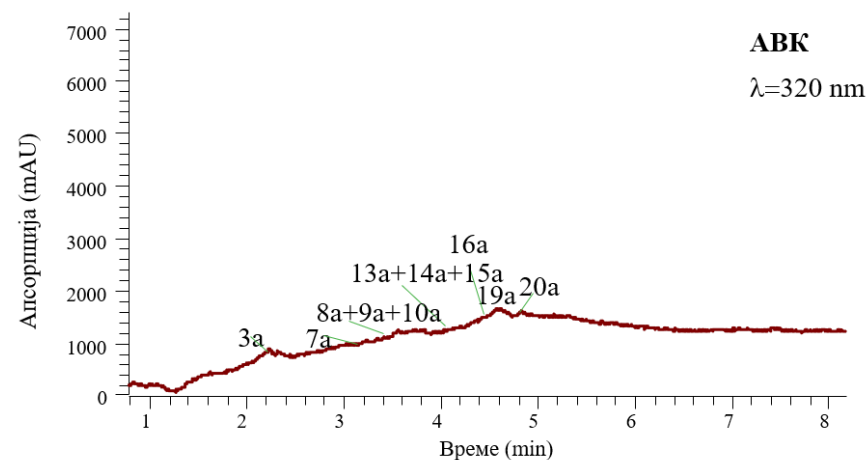
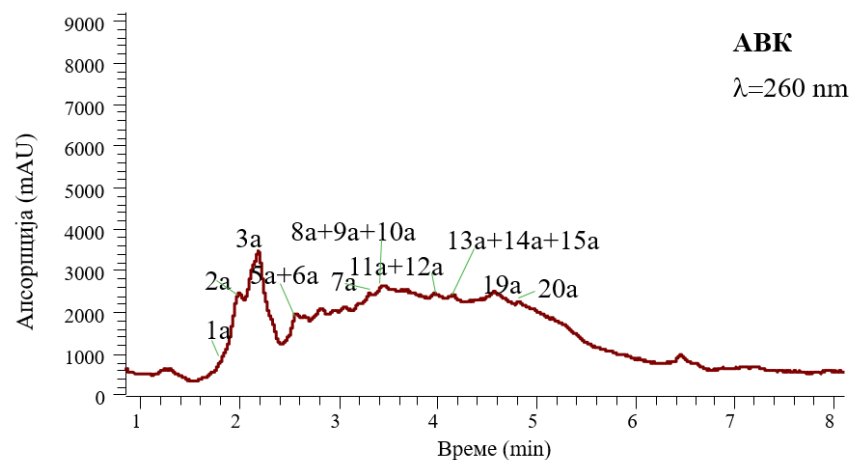
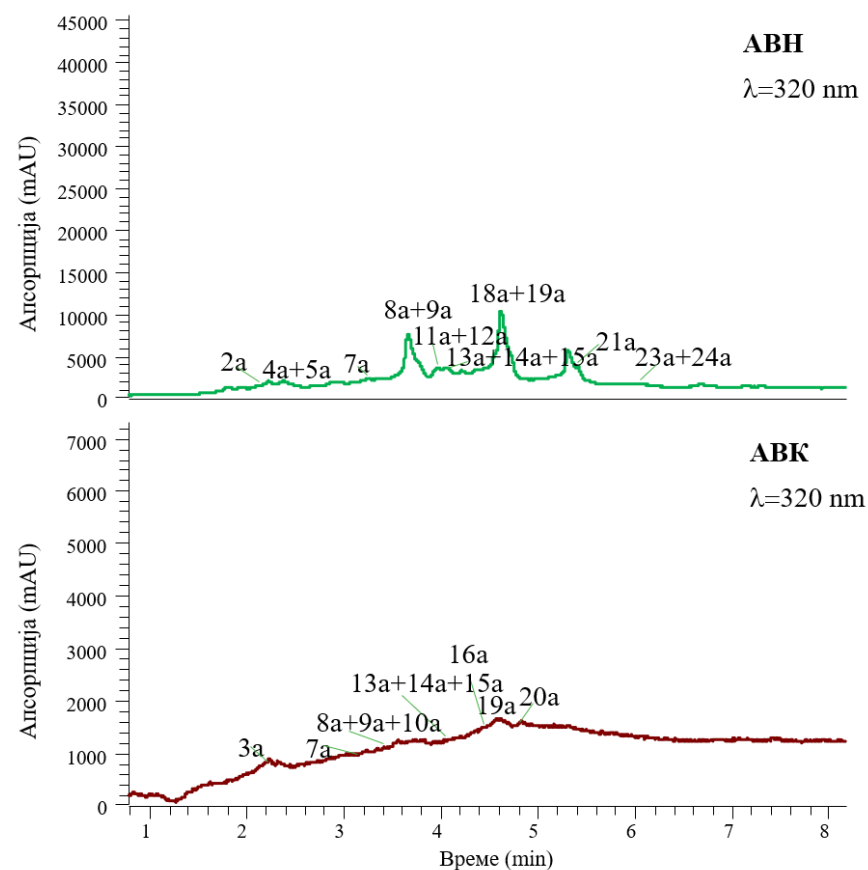
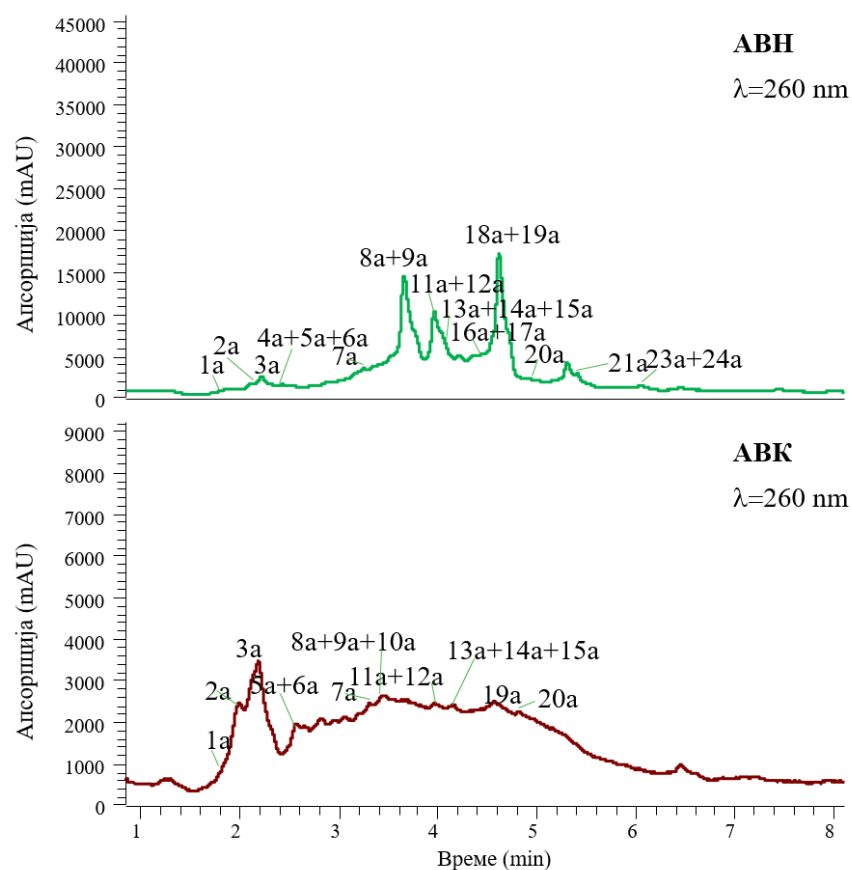
(**19a**), као и флавоноли апигенин (**23a**) и апигетрин (апигенин-7-*O*-глукозид; **18a**). Такође, хроматографска анализа је показала да су у АВН у малој количини присутни и кумарини (ескулетин; **4a**), халкони (флоризин (флоретин-2-*O*-глукозид); **20a**) и стилбен гликозиди (полидатин (резвератрол-3-*O*-глукозид; **12a**).

У поређењу са надземним делом вирка, у екстракту корена *A. vulgaris* (АВК) идентификовано је мање компонената (18 једињења), представљених у Табели 8, а одговарајући хроматограми дати су на Сликама 24 и 25. Слично надземном делу вирка, и у корену су две доминантне групе фенолних једињења флаван-3-оли и бензоеве киселине. Флавоноли, бициклични флавоноиди, флаванони и циметне киселине су процентуално доста мање заступљени. Међу идентификованим једињењима је најзаступљенији катехин (**3a**; 18297,06 µg/g), након чега следе елагинска киселина (**11a**; 575,66 µg/g) и катехин-галат (**15a**; 336,27 µg/g). У односу на АВН, у екстракту корена *A. vulgaris* уочава се далеко већи садржај флоризина (**20a**; 110,51 µg/g), док је количина осталих једињења веома ниска (<25 µg/g). Иако у веома малој количини, кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин) је идентификован у АВК, за разлику од АВН, где његово присуство није доказано. У АВК су идентификовани и кверцитрин, кверцетин, кемферол, апигетрин и апигенин, али је њихова концентрација испод границе детекције уређаја.

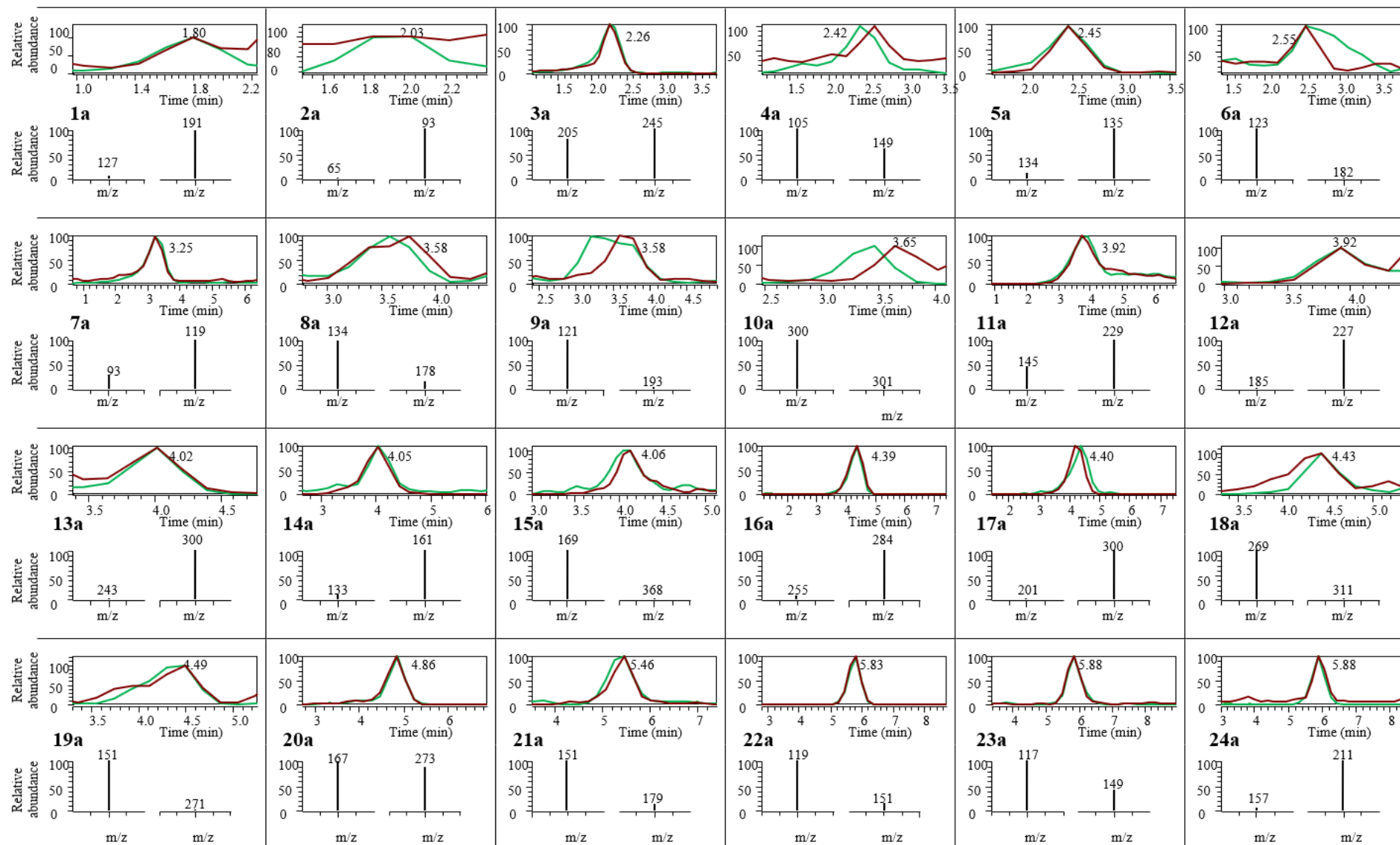
Табела 8. UHPLC-qqqMS² идентификација и квантификација фенолних једињења присутних у екстрактима надземног дела и корена *Alchemilla vulgaris* у моду праћења одабране реакције (SRM), коришћењем два дијагностичка MS² фрагмента.

(-)HESI-MS/MS подаци				Квантификација ^б		
Пик	Ретенционо време (min)	Назив једињења ^а	[M-H] ⁻	Дијагностички MS ² фрагменти [M-H] ⁻	ABH (µg/g екстракта)	ABK (µg/g екстракта)
1a	1,80	Хлорогенска киселина	353	127; 191	5,21 ± 0,20	1,41 ± 0,01
2a	2,03	p-хидроксибензоева киселина	137	137; 93	89,6 ± 19,8	4,13 ± 1,95
3a	2,26	Катехин	289	205; 245	1074 ± 46	18297 ± 133
4a	2,42	Ескулетин	177	105; 149	4,88 ± 1,47	н.д.
5a	2,45	Кафеинска киселина	179	134; 135	10,58 ± 0,88	1,36 ± 0,17
6a	2,55	Сирингична киселина	197	123; 182	1,92 ± 0,97	1,97 ± 0,13
7a	3,25	p-кумарна киселина	163	93; 119	42,17 ± 1,23	12,64 ± 0,95
8a	3,58	Ферулна киселина	193	134; 178	13,55 ± 1,028	3,92 ± 0,06
9a	3,58	Синапинска киселина	223	121; 193	0,89 ± 0,09	0,89 ± 0,03
10a	3,65	Рутин	609	301; 179	н.д.	0,49 ± 0,02
11a	3,92	Елагинска киселина	301	145; 229	1461 ± 12,48	575,66 ± 22,49
12a	3,92	Полидатин	389	185; 227	4,48 ± 0,95	12,55 ± 1,25
13a	4,02	Изокверцитрин	463	243; 300	183,74 ± 5,19	24,25 ± 6,30
14a	4,05	Рузмаринска киселина	359	133; 161	4,82 ± 2,01	3,70 ± 1,14
15a	4,06	Катехин-галат	441	169; 368	694,40 ± 6,48	336,27 ± 2,70
16a	4,39	Астрагалин	447	255; 284	96,97 ± 4,81	2,56 ± 0,30
17a	4,40	Кверцитрин	447	201; 300	3,85 ± 0,14	т
18a	4,43	Апигетрин	431	269; 311	0,06 ± 0,02	т
19a	4,49	Нарингин	579	151; 271	4,30 ± 0,25	2,99 ± 0,22
20a	4,86	Флоризин	435	167; 273	20,01 ± 0,98	110,51 ± 3,87
21a	5,46	Кверцетин	301	151; 179	20,13 ± 1,18	т
22a	5,83	Нарингенин	271	119; 151	1,14 ± 0,21	1,31 ± 0,16
23a	5,88	Апигенин	269	117; 149	0,30 ± 0,15	т
24a	5,88	Кемферол	285	157; 211	11,75 ± 0,47	т

^а Идентификација једињења извршена је на основу поређења са ретенционим временима, UV-Vis и MS спектрима стандардних једињења; ^б Концентрација једињења је изражена у µg/g сувог екстракта. Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± СЕМ; н.д. – није детектовано; т – присутно у траговима.



Слика 24. HPLC-DAD хроматограм фенолних једињења идентификованих у метанолном екстракту надземног дела (ABH) и корена (ABK) *Alchemilla vulgaris*. Називи идентификованих једињења дати су у оквиру Табеле 8.



Слика 25. SRM хроматограм са дијагностичким фрагментима за једињења идентификована у метанолном екстракту надземног дела и корена *A. vulgaris*. Зелена линија одговара стандардном једињењу, док црвена линија представља једињења присутна у екстрактима. Називи једињења представљени су у оквиру Табеле 8.

Резултати хроматографске анализе и фенолна једињења идентификована у *S. hortensis* представљена су у оквиру Табеле 9 и на Слици 26, а квантификација је вршена на основу поређења са калибрационим кривама добијеним за стандардна једињења. Укупно 20 фенолних једињења детектовано је и квантификовано у СХН екстракту. Хидроксициметне киселине и њихови деривати представљају најбројније и најзаступљеније компоненте екстракта чубра. У доста мањој количини, у екстракту чубра су идентификовани флаванони. Скоро четири пута мања количина флавона и десет пута мања заступљеност флавонола примећена је у овом узорку у односу на најзаступљенију групу једињења. Бензоеве киселине, као и кумарини и бициклични флавоноиди присутни су у неупоредиво нижим количинама.

Међу једињењима идентификованим у екстракту *S. hortensis* посебно се издваја рузмаринска киселина (**106**), која представља доминантну компоненту у екстракту чубра (24,90 mg/g). У високом проценту су, поред рузмаринске киселине, присутни и кафеинска киселина (**46**; 1,285 mg/g) и нарингенин (**196**; 1,061 mg/g). Са друге стране, гликозид нарингенина, нарингин (**146**) присутан је у скоро тридесет пута нижој концентрацији (35,80 µg/g). Међу осталим хидроксициметним киселинама, доказано је присуство изоферулне (**156**) и хлорогенске (**26**) киселине, као и синапинске киселине (**76**), али у веома ниској концентрацији. Изоферулна киселина показује карактеристичан прекурсор јон [ферулна киселина-Н]⁻ у негативном моду на m/z 193, док се масени фрагменти јављају на m/z 134 [ферулна киселина-Н-СОО-СН₃]⁻ и m/z 178 [ферулна киселина-СН₃]⁻. Када је реч о бензоевим киселинама, идентификоване су свега две компоненте – сиригична (**56**; 66,85 µg/g) и *p*-кумарна киселина (**66**; 23,96 µg/g).

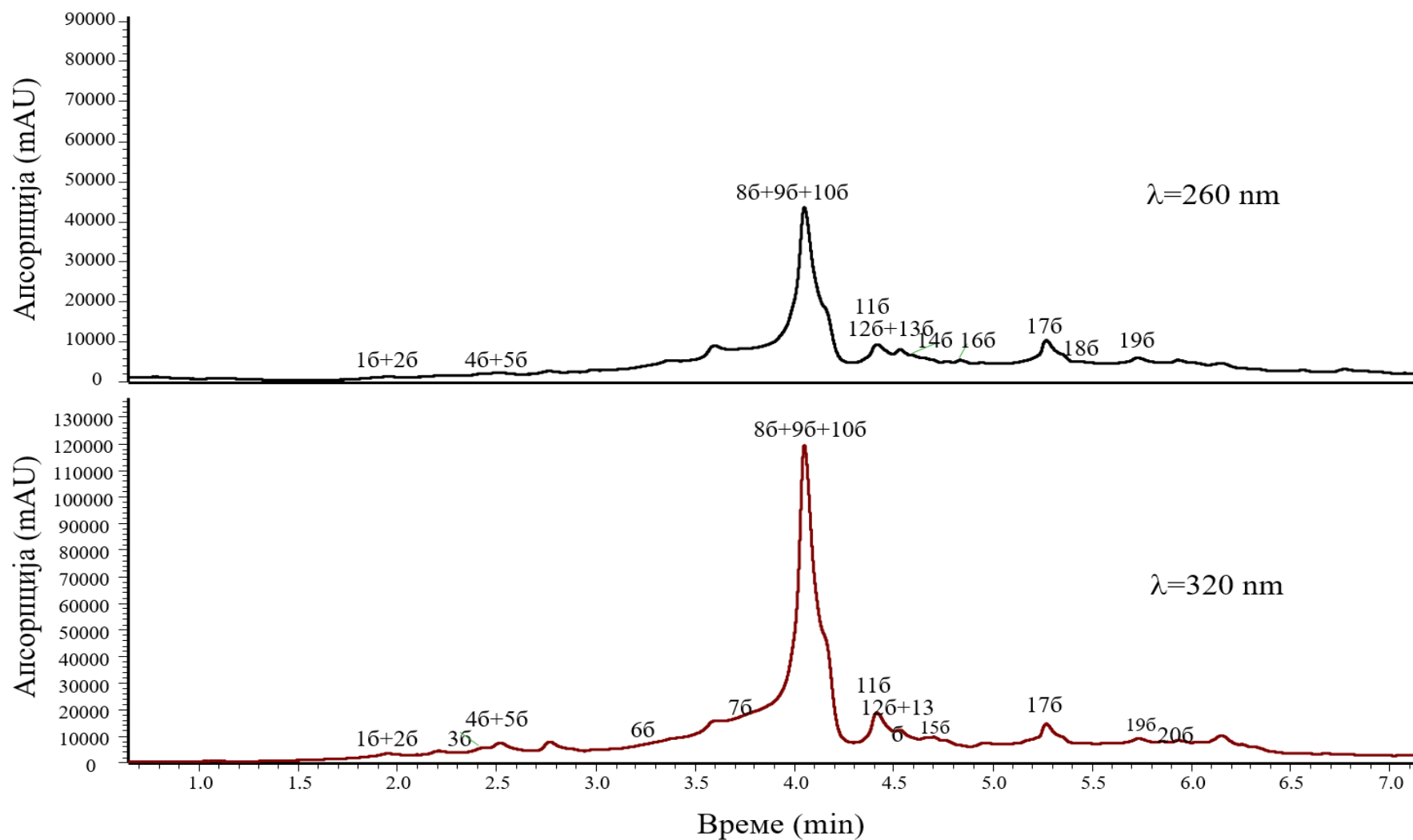
Флаволи и њихови деривати су такође идентификовани у екстракту СХН. Пикови **166** и **176** на хроматограму представљају агликоне апигенин и лутеолин. Прекурсорски јон лутеолина уочава се на m/z 285, док MS² фрагментација показује два фрагмента, први на m/z 133 [¹³В-Н]⁻, док је други на m/z 151 [¹³А-Н]⁻, указујући на ретро Diels-Alder-ов пут фрагментације лутеолина. Када је реч о гликозидима, у екстракту СХН идентификовани су апигенин-7-О-глукозид (**136**; апигетрин; 45,74 µg/g) и у доста нижој концентрацији (2,59 µg/g) апигенин-8-С-глукозид (**86**; витексин).

Међу флавонолима и њиховим гликозидима, у највећој мери је заступљен изокверцитрин, који је на хроматограму представљен пиком **96**. Концентрација кверцетина, као и астрагалина, је у екстракту СХН била скоро три пута нижа (21,84 и 14,82 µg/g), док је пак количина кверцитрина (**186**) неупоредиво мања (0,11 µg/g). У концентрацијама које су приближне концентрацији флавонола, у екстракту СХН срећу се кумарини ескулетин (**36**) и његов гликозид ескулин (**16**).

Табела 9. UHPLC-qqqMS² идентификација и квантификација фенолних једињења присутних у екстракту *Satureja hortensis* коришћењем два дијагностичка MS² фрагмента и података добијених DAD детектором.

(-)HESI-MS/MS подаци				DAD подаци		Квантификација ^б	
Пик	Ретенционо време (min)	Назив једињења ^а	[M–H] [–]	Дијагностички MS ² фрагменти [M–H] [–]	Ретенционо време (min)	λmax (nm)	CXН (μg/g екстракта)
16	1,86	Ескулин	339	133; 177	1,80	250, 330	22,33 ± 0,46
26	1,99	Хлорогенска киселина	353	127; 191	1,93	230, 330	15,99 ± 0,14
36	2,42	Ескулетин	177	105; 149	2,35	250, 350	10,17 ± 1,78
46	2,45	Кафеинска киселина	179	134; 135	2,38	230, 330	1285,42 ± 11,52
56	2,55	Сирингична киселина	197	123; 182	2,50	220, 270	66,85 ± 1,88
66	3,25	<i>p</i> -Кумарна киселина	163	93; 119	3,18	220, 310	23,96 ± 0,84
76	3,77	Синапинска киселина	223	121; 193	3,70	240, 330	0,93 ± 0,07
86	3,87	Апигенин 8- <i>C</i> -глукозид	431	269; 311	3,80	270, 340	2,59 ± 0,07
96	4,02	Кверцетин-3- <i>O</i> -глукозид	463	243; 300	3,95	260, 350	71,05 ± 2,43
106	4,09	Рузмаринска киселина	359	133; 161	4,03	240, 330	24900,67 ± 127,35
116	4,39	Кемферол-3- <i>O</i> -глукозид	447	255; 284	4,32	260, 350	14,82 ± 1,07
126	4,40	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид	447	201; 300	4,35	270, 350	0,11 ± 0,02
136	4,61	Апигенин-7- <i>O</i> -глукозид	431	269; 311	4,55	270, 340	45,74 ± 0,93
146	4,68	Нарингин	579	151; 271	4,60	270, 330	35,80 ± 0,94
156	4,70	Изоферулна киселина	193	134; 178	4,62	220, 320	220,11 ± 3,07
166	4,86	Флоризин	435	167; 273	4,80	280, 330	6,25 ± 0,22
176	5,32	Лутеолин	285	133; 151	5,26	270, 350	55,97 ± 0,33
186	5,46	Кверцетин	301	151; 179	5,40	260, 370	21,84 ± 0,70
196	5,83	Нарингенин	271	119; 151	5,76	280, 330	1061,75 ± 6,85
206	5,88	Апигенин	269	117; 149	5,80	270, 330	165,81 ± 0,31

^а Идентификација једињења извршена је на основу поређења са стандардним једињењима.^б Концентрација једињења је изражена у μg/g сувог екстракта. Резултати су представљени као средња вредност три мерења ± СЕМ.



Слика 26. HPLC-DAD хроматограм фенолних једињења идентификованих у метанолном екстракту надземног дела *Satureja hortensis*. Називи идентификованих једињења дати су у оквиру Табеле 9.

Добијени резултати су у сагласности са претходно спроведеним истраживањима на биљкама *A. vulgaris* и *S. hortensis*. Наиме, Neagu и сар.⁶¹ су показали да је елагинска киселина најзаступљеније једињење у водено-алкохолном екстракту надземног дела *A. vulgaris*. Елагинска киселина се наводи као једна од главних фенолних компонената и у истраживањима спроведеним од стране El-Hadidy и сар.³⁵⁸ и Møller и сар.⁷⁵ У класи фенолних киселина, у надземном делу *A. vulgaris* су, поред елагинске киселине, идентификоване још и гална, салицилна, *trans*-циметна, гентизинска, протокатехинска, сиригична, *p*-кумарна, кафеинска и синапинска киселина.^{61,64,74,89,358} Гална, кафеинска и гентизинска киселина су идентификоване и у другим врстама рода *Alchemilla*.⁷⁰ Иако је једно од доминантних једињења у АВН екстракту, естар галне киселине и катехина (катехин-галат), досадашње студије нису откриле његово присуство како у екстрактима *A. vulgaris*, тако ни у другим биљним врстама овог рода. Ферулна киселина је детектована у великој количини и у комерцијално доступном биљном препарату вирка (чај).³⁵⁹ Неколико аутора је такође показало присуство хлорогенске киселине, једне од најзаступљенијих деривата хидроксициметних киселина у фамилији Rosaceae, у екстрактима надземног дела *A. vulgaris*^{358,360}, а детектована је и у екстракту АВН. Високе концентрације катехина у екстрактима *A. vulgaris* примећене су и у студијама других аутора.^{61,358} Са друге стране, бициклични флавоноиди и њихови деривати (флоретин и флоризин) су по први пут идентификовани у роду *Alchemilla* у оквиру ове дисертације, као и дериват кумарина, ескулетин.

Резултати UHPLC-MS² добијени у оквиру ове дисертације су у сагласности са претходно објављеним подацима о флавоноидним компонентама и њиховим дериватима из рода *Alchemilla*. Поједини аутори^{65,69,77} су показали да су 3-*O*-гликозиди кверцетина и кемферола заступљени у надземним деловима других биљака рода *Alchemilla*. Флавонолни гликозиди рутин и кверцитрин су такође идентификовани и у ендемским врстама рода *Alchemilla* са територије Турске.⁶² Увидом у доступну научну литературу, 3-*O*-глукозид кемферола, астрагалин, идентификован је по први пут у *A. vulgaris* хроматографском анализом у овом раду. Ово једињење је потврђено још једино у *A. speciosa*.⁷⁷ Супротно претходно наведеним студијама, истраживање различитих врста рода *Alchemilla* са подручја Исланда, укључујући и *A. vulgaris*, показало је да етанолни екстракти ових биљака не садрже флавоноиде и њихове деривате.⁶⁸ Објашњење изостанка биосинтетског пута флавоноида лежи у чињеници да географско подручје, климатски и еколошки фактори детерминишу хемијски профил биљака. Како се флавоноидна једињења сматрају протекторима биљака од UV-B зрачења и учествују у алелопатским

интеракцијама биљака и инсеката, разлика у фитохемијском профилу истоветних биљних врста са простора Европе и Исланда условљена је мањом изложеношћу биљке светлости, те мањим бројем инсеката у северним подручјима, што даље води адаптацији биљке на еколошке факторе средине, те изостанку експресије гена биосинтезе једињења флавоноидног типа.⁶⁸

Разлике у квантитативном садржају полифенолних једињења у надземном делу *A. vulgaris* могу се јавити и као последица различитог типа растварача коришћеног приликом екстракционог процеса. У већини случајева, екстракција је вршена етанолом (70% раствор) и водом, сугеришући тиме да поларност растварача којим је вршена екстракција игра значајну улогу у коначној количини екстрахованих фенолних једињења, као и њиховој процентуалној заступљености. Резултати истраживања које су спровели Condrat и сар.⁶⁴ показали су да екстракција 96% метанолом доприноси ефикаснијој екстракцији флавоноида кверцетина, кемферола и рутина из надземног дела *A. vulgaris* у поређењу са растварачем који садржи већи проценат воде (80% метанол). Са друге стране, скоро четири пута већа концентрација елагинске киселине добијена је мацерацијом са 80% пропилен-гликолом, у поређењу са екстрактом АВН, а знатно већа количина је детектована и у воденом и 70% етанолном екстракту.³⁶¹ Потенцијални разлог за овакве резултате може бити порекло узорка, узимајући у обзир да је у предоченој студији анализиран комерцијално доступан надземни део вирка. Одступања у погледу доминантних компонената у хемијском профилу вирка могуће је објаснити и са аспекта различитих фаза у којима је биљка узоркована. Како је познато у традиционалној медицини, надземни део *A. vulgaris* се за примену у терапеутске сврхе бере у фази цветања (од маја до августа). У истраживању спроведеном од стране Duckstein и сар.³⁶⁰ показано је да количина фенолних једињења варира током овог периода, те да је концентрација свих полифенолних једињења, са посебним акцентом на галну киселину и агримонин (олигомерни елагитанин) далеко виша у последњој фази цветања.

На основу досадашњих литературних података, може се са сигурношћу тврдити да резултати хроматографске анализе екстракта корена *A. vulgaris* добијени у овој дисертацији по први пут сведоче о присуству фенолних једињења у овом узорку. Иако је мали број истраживања укључивао студије на корену биљних врста рода *Alchemilla* (*A. mollis* и *A. persica*), она су ограничена на специфичне биолошке активности, без фокуса на анализу хемијског састава.⁸⁰ Посматрајући фамилију Rosaceae, којој припада *A. vulgaris*, уочавају се извесне сличности у погледу хемијског састава. Флаван-3-оли, пре свега катехин и његови деривати, као и елагинска киселина, представљају неке од

кључних идентификованих компонената и у корену одређених биљака фамилије Rosaceae и трибусу *Potentilleae*.^{362,363} Како су ове две компоненте одговорне за формирање хидролизабилних танина, може се претпоставити да су управо танини доминантна група фенолних једињења у корену *A. vulgaris*. Свеобухватније хроматографске анализе, које би укључивале већи број врста рода *Alchemilla*, допринеле би расветљавању њиховог хемијског састава, као и могућности за евентуално детерминисање хемотаксономских маркера.

У поређењу са хемијском анализом етарског уља *S. hortensis*, екстракти чубра су слабо испитивани. Упоредјујући резултате добијене у оквиру ове дисертације са истраживањима публикованим од стране других аутора, потврђује се да је рузмаринска киселина доминантна компонента у екстрактима *S. hortensis*.^{132,139,364,365} Уколико се посматра фамилија Lamiaceae, рузмаринска киселина је карактеристична једино за субфамилију Nepetoideae, што је чини значајним таксономским маркером.³⁶⁶ Међутим, треба истаћи да избор процеса екстракције утиче на бољу екстракцију појединих фенолних компонената. Разлика у погледу хемијског профила евидентирана је поређењем екстракта добијеног мацерирањем и неконвенционалним типовима екстракције.¹³³ У поменутој студији се истиче да је рутин доминантна компонента у екстрактима чубра добијеним применом микроталасне и ултразвучне екстракције, као и екстракцијом суперкритичном водом, а да екстракти припремљени мацерирањем и екстракцијом по Soxlet-у садрже највише рузмаринске киселине. Оваква промена у хемијском профилу може бити објашњена потенцијалном деградацијом фенолних киселина приликом излагања таласима високе фреквенције и/или загревањем. Ипак, количина рузмаринске киселине идентификована у представљеној студији била је скоро десет пута нижа у односу на њену концентрацију одређену у екстракту СХН у овој дисертацији, што може бити узроковано различитим локалитетима и типовима земљишта са којих је биљка узоркована. Са друге стране, приближно иста количина рузмаринске киселине детектована је у етанолном екстракту надземног дела чубра добијеним поступком екстракције по Soxlet-у у студији Маšković и сар.¹³⁴ и у метанолном екстракту СХН испитиваном у овој дисертацији.

Присуство кафеинске киселине, али и њених олигомера - клиноподичних киселина потврђено је за метанолни екстракт *S. hortensis*.¹⁴² Способност синтезе олигомера кафеинске киселине је карактеристично генерално за све биљне врсте потфамилије Nepetoideae у оквиру фамилије Lamiaceae, те су она означена као хемотаксономски маркери. Међутим, треба узети у обзир да је њихова идентификација могућа једино у

свежој биљци; лиофилизовани или осушени узорци садрже неупоредиво мање количине ових једињења, те стога она нису била идентификована у појединим студијама.¹⁶⁸ Резултати истраживања у овој дисертацији по први пут указују на веће количине изомера ферулне киселине - изоферулне киселине у роду *Satureja*.

Флавоноиди и њихови деривати, са посебним нагласком на флаванол кверцетин и његове гликозиде, су такође важна група једињења у *S. hortensis*, што потврђују и истраживања других аутора.¹³³ Знатно веће количине флавонолног гликозида нарингенина, као и флавона апигенина уочене су у екстракту СХН испитиваном у овој дисертацији, у односу на резултате других аутора, што може бити повезано са типом екстракције и примењеног растварача.¹³³

5.2. Садржај фенолних једињења у екстрактима испитиваних биљака

Употребом различитих UV-Vis спектрофотометријских метода, у испитиваним екстрактима је одређен садржај укупних фенолних једињења, флавоноида, хидроксициметних киселина, кондензованих и галотанина, као и укупних и мономерних антоцијана. Резултати спектрофотометријских одређивања приказани су у оквиру Табеле 10. Приказани резултати представљају средњу вредност три паралелна мерења $\pm$ стандардна девијација.

Табела 10. Спектрофотометријско одређивање садржаја различитих класа фенолних једињења

Класа фенолних једињења/Екстракти	АВН	АВК	СХН
Укупна фенолна једињења (mg ЕГК/g)	558,19 $\pm$ 2,79 ^a	442,32 $\pm$ 12,88 ^b	386,50 $\pm$ 4,31 ^b
Укупни флавоноиди (mg ЕРУ/g)	13,30 $\pm$ 0,98 ^a	19,80 $\pm$ 0,20 ^b	38,13 $\pm$ 0,86 ^b
Хидроксициметне киселине (mg ЕКК/g)	33,43 $\pm$ 0,66 ^a	114,72 $\pm$ 2,99 ^b	86,64 $\pm$ 0,99 ^b
Кондензовани танини (mg ЕГК/g)	171,57 $\pm$ 3,94 ^a	81,44 $\pm$ 1,25 ^b	186,29 $\pm$ 5,93 ^a
Галотанини (mg ЕГК/g)	97,98 $\pm$ 3,00 ^a	- ^b	72,89 $\pm$ 0,63 ^b
Укупни антоцијани (mg ЕЦЗГ/g)	8,41 $\pm$ 0,1 ^a	1,36 $\pm$ 0,04 ^b	1,89 $\pm$ 0,17 ^b
Мономерни антоцијани (mg ЕЦЗГ/g)	2,68 $\pm$ 0,1 ^a	0,18 $\pm$ 0,04 ^b	1,73 $\pm$ 0,17 ^b

Легенда: - није идентификовано; ЕГК - еквиваленти галне киселине; ЕРУ - еквиваленти рутина; ЕКК - еквиваленти кафеинске киселине; ЕЦЗГ - еквиваленти цијанидин-3-глукозида. Различите словне ознаке у експоненту за исти параметар указују на статистички значајне разлике при $p < 0,05$.

Укупна фенолна једињења одређена су методом по Фолину, а резултати показују да су *A. vulgaris* и *S. hortensis* богате у погледу ове групе једињења. На основу резултата

добитијених Фолиновом методом, може се закључити да су апроксимативно више од трећине масе добијених екстракта обе испитиване биљке фенолна једињења. Иако добијени резултати спектрофотометријског одређивања фенолних једињења дају резултате изражене у еквивалентима одговарајућег фенолног једињења, из добијених резултата за екстракте испитиваних биљака може се видети да обе биљке поседују флавоноиде и антоцијане у ниским концентрацијама, а да су знатно богатије у садржају фенолних киселина и танина.

Оба екстракта биљке *A. vulgaris* садрже знатно већу концентрацију укупних фенолних једињења у односу на екстракт *S. hortensis*, при чему је екстракт надземног дела вирка најбогатији фенолним једињењима (558,19 mg ЕГК/g). Такав тренд запажен је и у случају галотанина и антоцијана. Наиме, у корену вирка, галотанини нису идентификовани спектрофотометријски. Са друге стране, концентрација галотанина у екстракту СХН је била приближна њиховом садржају у АВН, али је уочено да постоји статистички значајна разлика у њиховој количини. Када је реч о антоцијанима, значајна одступања у количини примећена су између сва три испитивана екстракта, будући да је количина и укупних и мономерних антоцијана у АВН (8,41 mg ЕЦЗГ/g и 2,68 mg ЕЦЗГ/g) била виша чак и од збирне количине антоцијана у АВК и СХН. Очекивано, најнижа количина и укупних и мономерних антоцијана примећена је у екстракту корена *A. vulgaris*.

Реакцијом са алуминијум-хлоридом одређивана је количина укупних флавоноида у екстрактима. Резултати ове спектрофотометријске анализе показали су да се у екстракту надземног дела чубра налази највише флавоноидних једињења (38,13 mg еквивалената рутина у g екстракта). У поређењу са надземним делом вирка (13,30 mg ЕРУ/g), у екстракту корена је садржан већи проценат флавоноида (19,80 mg ЕРУ/g). Поред тога, екстракт корена се показао као скоро четвороструко богатији хидроксициметним киселинама у односу на АВН, док су у екстракту СХН оне заступљене у 1,5 пута мањој количини него што је у случају АВК, а скоро 2,5 пута више него у АВН.

Таложењем танина помоћу калијум-јодата добијени су подаци који указују да не постоји статистички значајна разлика између количине кондензованих танина присутних у АВН и СХН (171,57 и 186,29 mg ЕГК/g), иако је њихова количина била за нијансу виша у екстракту *S. hortensis*. Кондензовани танини су у екстракту корена вирка присутни у скоро двоструко нижој концентрацији, са 81,44 mg еквивалената галне киселине у g екстракта.

Присуство велике количине укупних фенолних једињења у екстракту *A. vulgaris* потврђено је и у ранијим студијама. Компаративна анализа воденог и водено-алкохолног

екстракта показала је да је 70% етанолни екстракт богатији фенолима у односу на водени (112,33 и 94,66 mg ЕГК/g)⁶¹, што је скоро 5 пута ниже у односу на количину укупних фенола одређену у овом раду. Истоветна зависност примећена је и по питању проантоцијанидина, где се етанолни екстракт показао као богатији кондензованим танинима у односу на водени, а оба су садржала нижу количину ове групе једињења у односу на АВН. Друга студија је показала да је у 100 грама екстракта надземног дела вирка заступљен висок садржај фенола (6,25 g еквивалената пирогалолола).⁸⁴ Како постоје различити начини интерпретације резултата у зависности од референтног једињења у односу на које је посматрана количина укупних фенола, није могуће извршити поређење ових резултата са резултатима добијеним у овој дисертацији. Као што је већ претходно напоменуто, хемијски састав корена *A. vulgaris* је по први пут предочен научној јавности у овој дисертацији.

У поређењу са резултатима Маšković и сар.¹³³, екстракт СХН испитиван у овој дисертацији показује троструко већу количину фенолних једињења у односу на етанолни екстракт припремљен различитим методама екстракције, која је у опсегу 119,28 - 151,54 mg ЕГК/g екстракта. Истовремено, и концентрације флавоноида, кондензованих танина и галотанина су у поменутој студији биле доста ниже у односу на резултате добијене испитивањем СХН. Супротно резултатима у овој дисертацији, количина укупних антоцијана је била неупоредиво виша у поменутном истраживању.

5.3. Антиоксидативна активност екстракта испитиваних биљака

Узимајући у обзир да су модуси деловања антиоксиданата различити, у циљу процене антиоксидативног капацитета екстракта коришћено је седам антиоксидативних тестова базираних на различитим механизмима испољавања антиоксидативне активности. Антиоксидативно деловање екстракта поређено је са добро познатим природним антиоксидантима (елагинска киселина и катехин) и синтетским антиоксидантом (бутиловани хидрокситолуен, БХТ) на основу концентрације која доводи до 50% инхибиције стварања слободних радикала или њихове неутрализације, а добијени резултати су представљени у оквиру Табеле 11 и на Слици 27.

Тестови базирани на способности неутрализације слободних радикала путем електронског трансфера или донирањем атома водоника, представљају неке од најчешће примењиваних антиоксидативних тестова. Методе које су базиране на овом приступу обухватају стабилне радикалске форме DPPH[•] и ABTS^{•+}, као и хидроксил радикал (OH[•]),

који је за разлику од два претходно поменута, присутан у биолошким системима.

Иако не постоје у биолошким условима, испитивање антиоксидативне активности се често спроводи на $\text{DPPH}^{\bullet}$ и $\text{ABTS}^{+\bullet}$ радикалима, који поседују високу стабилност радикалске форме, захваљујући делокализацији неспареног електрона преко целог молекула.^{367,368} Статистички значајна разлика у погледу неутрализације $\text{DPPH}^{\bullet}$ радикала уочена је између тестираних екстраката. Међу тестираним узорцима најпотентнијим се показао екстракт надземног дела вирка ($4,80 \mu\text{g/mL}$), са IC_{50} вредношћу која је, иако је незнатно виша, упоредива са IC_{50} концентрацијом за елагинску киселину ($3,65 \mu\text{g/mL}$). И екстракт корена вирка, као и екстракт надземног дела чубра показују одличан степен неутрализације $\text{DPPH}^{\bullet}$ радикала при изразито ниским концентрацијама ($11,86$ и $22,55 \mu\text{g/mL}$), које превазилазе IC_{50} вредности синтетског антиоксиданта БХТ ($26,01 \mu\text{g/mL}$).

Када је реч о $\text{ABTS}^{+\bullet}$ радикал-катјону, примећено је да и испитивани екстракти и стандарди доприносе деколорацији раствора овог стабилног радикала при веома ниским концентрацијама. Сви испитивани екстракти, а посебно екстракт надземног дела вирка ($\text{IC}_{50} = 14,80 \mu\text{g/mL}$), испољили су снажније антиоксидативно деловање ($p < 0,05$) у односу на БХТ ($\text{IC}_{50} = 44,47 \mu\text{g/mL}$). Супротно томе, IC_{50} вредност добијена за екстракте била је значајно виша ($p < 0,05$) у односу на референтне природне антиоксиданте, елагинску киселину и катехин.

Хидроксил радикал је један од најреактивнијих и краткоживећих слободних радикала и у биолошким системима настаје првенствено разградњом водоник пероксида. Његова инхибиција представља једну од стратегија за превазилажење липидне пероксидације и дегенеративних промена на нивоу нуклеинских киселина.³⁶⁹ Резултати истраживања у оквиру ове дисертације указују на то да не постоји статистички значајна разлика између антиоксидативног потенцијала екстракта СХН и референтних стандарда ($p > 0,05$), док је концентрација која доводи до инхибиције 50% $\text{OH}^{\bullet}$ радикала за АВН била двоструко ($13,06 \mu\text{g/mL}$), а за АВК приближно три пута виша ($18,45 \mu\text{g/mL}$) од вредности добијених за референтне антиоксиданте. Ипак, од испитиваних узорака екстраката и стандарда, најмању способност неутрализације $\text{OH}^{\bullet}$ радикала показује БХТ ($\text{IC}_{50} = 21,94 \mu\text{g/mL}$).

Узимајући у обзир сва три теста у испитивању способности неутрализације слободних радикала, екстракти вирка и чубра поседују веома висок потенцијал. У све три поменуте методе испољили су снажније дејство неутралисања слободних радикала у односу на синтетички антиоксидант БХТ, док није било статистички значајне разлике

($p > 0,05$) у антиоксидативном деловању екстракта чубра, елагинске киселине и катехина на $\text{OH}^\bullet$ радикале.

Табела 11. Антиоксидативна активност метанолних екстраката надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis*

Узорак	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)					
	DPPH $^\bullet$	ABTS $^{\bullet+}$	$\text{OH}^\bullet$	Липидна пероксидација	Капацитет хелатације	УАА (mg AK/g)
АВН	$4,80 \pm 0,02^a$	$14,80 \pm 0,11^a$	$13,06 \pm 0,30^a$	$33,57 \pm 3,61^a$	> 2000	$265,62 \pm 6,99^a$
АВК	$11,86 \pm 0,03^b$	$32,47 \pm 0,04^b$	$18,45 \pm 0,59^b$	$482,86 \pm 17,80^b$	>2000	$316,47 \pm 10,80^b$
СХН	$22,55 \pm 0,14^B$	$29,69 \pm 0,43^B$	$6,68 \pm 1,10^B$	$47,97 \pm 4,82^a$	>2000	$328,10 \pm 3,07^b$
ЕК	$3,65 \pm 0,06^Г$	$8,14 \pm 0,10^Г$	$7,18 \pm 0,33^B$	$10,92 \pm 1,40^{a,B}$	>2000	н.т.
КАТ	$7,47 \pm 0,01^Д$	$5,97 \pm 0,12^Г$	$6,33 \pm 0,36^B$	$7,20 \pm 1,78^{a,B}$	>2000	н.т.
БХТ	$26,01 \pm 0,18^h$	$44,47 \pm 1,16^Д$	$21,94 \pm 0,44^Г$	$5,66 \pm 0,80^{a,B}$	>2000	н.т.
ЕДТА	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.	$4,10 \pm 0,02$	н.т.

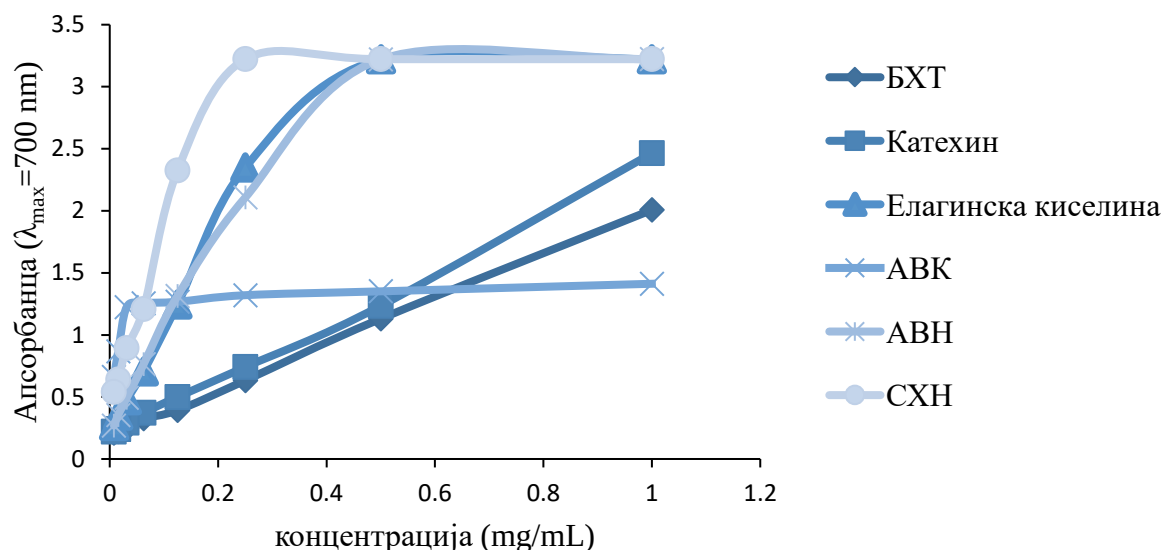
Легенда: н.т. - није тестирано; УАА - укупна антиоксидативна активност; ЕК - елагинска киселина; КАТ - катехин; БХТ - бутиловани хидрокситолуен; ЕДТА - етилендиаминтетрасирћетна киселина; АК - аскорбинска киселина. Различите словне ознаке у експоненту у оквиру колоне указују на статистички значајне разлике при $p < 0,05$.

Један од видова антиоксидативне заштите базиран је на способности везивања јона метала, пре свега јона гвожђа и бакра. Хелатациона способност екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis* испитивана је тестом заснованим на инхибицији грађења ружичасто обојеног комплекса између ферозина и двовалентног гвожђа, чиме се директно имплицира да је прооксидантни феро јон хелатиран од стране екстракта. Биолошки смисао овог механизма огледа се у чињеници да су процеси попут липидне пероксидације катализовани јонима прелазних метала, те се стога њихово комплексирање од стране екстраката, тј. антиоксидативних принципа присутних у њима, сматра једном од стратегија смањења слободнорадикалских врста. Томе у прилог говори и чињеница да се хидроксил радикали стварају Фентоновом реакцијом из водоник-пероксида у реакцији катализованој феро јонима или јонима других прелазних метала, па се може сматрати да потенцијал за хелатирање гвожђа индиректно доприноси смањењу генерисања слободнорадикалских облика кисеоника. Ипак, резултати испитивања хелатационе моћи екстраката показали су да ниједан од испитиваних екстраката, као ни референтних фенолних једињења и стандарда не показује хелатационе особине у концентрацији од 2 mg/mL ($\text{IC}_{50} > 2 \text{ mg/mL}$), будући да су апсорбације радних проба у наведеној концентрацији биле истоветне

контролном узорку. Као што је и очекивано, једина промена уочена је на нивоу комплекса натријумове соли етилендиаминтетрасирћетне киселине, познатог хелатног лиганда, који у концентрацији од 4,10 $\mu\text{g/mL}$ хелира 50% феро јона.

Укупна антиоксидативна активност одређена је фофсомолибденском методом, која је такође базирана на оксидо-редукционом механизму. Резултати су изражени у еквивалентима аскорбинске киселине, при чему виша вредност корелира јачем укупном антиоксидативном потенцијалу. Уочено је да су вредности добијене за екстракте АВК и СХН приближне и да не постоји статистички значајна разлика између њих ($p > 0,05$) (316,47 за АВК и 328,10 mg AK/g за СХН). Значајна разлика ($p < 0,05$) уочава се у случају екстракта надземног дела вирка, код ког је укупна антиоксидативна активност 265,62 mg аскорбинске киселине по граму екстракта.

Редуктивни капацитет екстракта испитиван је методом заснованом на редукцији ферицијанида до фероцијанида у присуству антиоксиданата, чиме се заправо процењује способност екстракта и њихових компонената да делују као електрон донори у биолошким системима. На основу чињенице да већа апсорбанца одговара јачој редуктивној способности, погледом на представљени график (Слика 27) уочава се да при највишој испитиваној дози (1 mg/mL) екстракти СХН и АВН, као и елагинска киселина, испољавају максимални редуктивни потенцијал (максимална очитана апсорбанца апарата). При истој концентрацији, редуктивни капацитет БХТ и катехина је знатно нижи, док је екстракта корена (АВК) показао најслабију моћ редукције Fe^{3+} јона. Смањење концентрације (0,5 mg/mL) узрокује линеарно смањење редуктивне моћи катехина и БХТ, док је редуктивни капацитет екстракта и елагинске киселине непромењен у односу на највишу тестирану концентрацију. Тренд смањења редуктивног потенцијала примећује се при нижим концентрацијама и екстракта и стандарда, с тим што при нижим концентрацијама, елагинска киселина и АВН показују готово идентичне вредности, док у поређењу са ова два узорка, екстракт СХН показује скоро дупло више вредности апсорбанције, што указује на јачу способност редукције гвожђа (III) до гвожђа (II). Ови резултати су, још једном, потврдили изузетан потенцијал *A. vulgaris* и *S. hortensis*, истичући да механизам њиховог дејства на слободне радикале може бити и путем донирања електрона које највероватније потиче од различитих фенолних једињења у овим екстрактима, попут елагинске киселине и катехина.



Слика 27. Редуктивна активност екстраката надземног дела (ABH) и корена вирка (ABK) и надземног дела чубра (CXH), референтних једињења и синтетског антиоксиданта (BHT).

Егзогени стресори, подједнако као и ендогени процеси у људском организму, узрокују формирање слободних радикала. Када су присутни у великим количинама, слободни радикали делују као иницијатори процеса апстракције протона са незасићене везе између два угљеникова атома, превасходно полинезасићених масних киселина, и започињања каскадне реакције липидне пероксидације, што је један од узрока кварења намирница и измене њених органолептичких карактеристика.³⁷⁰ Гвожђе-тиоцијанатна метода примењена је у циљу одређивања способности екстраката да врше инхибицију пероксидације линолне киселине. Међу испитиваним екстрактима, приближно исти ефекат на смањење степена оксидативног оштећења примењено је за ABH (33,57 $\mu\text{g/mL}$) и CXH (47,97 $\mu\text{g/mL}$; $p > 0,05$), док је IC_{50} вредност за ABK била више него десет пута виша (482,86 $\mu\text{g/mL}$). У поређењу са стандардним једињењима и синтетским антиоксидантом, уочено је да не постоји значајна разлика у испољеном ефекту у односу на ABH ($p > 0,05$), иако су добијене вредности за стандардна фенолна једињења биле ниже од вредности за ABH. Може се истаћи да иако CXH и ABH показују значајан степен инхибиције липидне пероксидације, бољи ефекат су испољили приликом испитивања неутрализације слободних радикала (ниже IC_{50} вредности). Овакав ефекат може се приписати слабијем антиоксидативном деловању компонената екстраката у хетерогеним системима (емулзија линоле киселине у пуферу), узимајући у обзир њихов висок садржај фенолних једињења која се боље растварају у воденој фази него у липидима.

Приликом испитивања антирадикалске активности *A. vulgaris*, Nikolova и сар.⁷⁴ су утврдили да 80% метанолни екстракт надземног дела вирка у концентрацији 19,62 µg/mL инхибира 50% DPPH радикала, што је упоредиво са резултатима добијеним за стандардни антиоксидант БХТ. Веома ниске IC₅₀ вредности добијене су у ранијим испитивањима и за етанолни, водени и пропиленгликолни екстракт *A. vulgaris*³⁶¹ (редом 0,11; 27,22 и 2,88 µg/mL), што је у сагласности са резултатима наших истраживања. Поједини аутори испитивали су могућност примене екстракта листова *A. vulgaris* као конзерванса у прехранбеној индустрији. Апликација 0,1% водено-етанолног екстракта условила је инхибицију липидне пероксидације у говеђој паштети током 14 дана чувања, што је било упоредиво за вредностима добијеним за комерцијални БХТ. Такође, значајне разлике у корист екстракта вирка у односу на БХТ примећене су и у свежини и боји меса.³⁷¹

Када је реч о екстракту *S. hortensis*, резултати добијени у истраживањима¹³³ показали су да екстракти припремани конвенционалним и/или алтернативним видовима екстракције испољавају снажну антиоксидативну активност на нивоу DPPH, ABTS и OH радикала, као и у модел систему емулзије линолна киселина-вода, са посебним акцентом на резултате добијене за екстракте добијене суперкритичном екстракцијом, чије су вредности у корелацији са представљеним у овој дисертацији. Слични резултати објављени су и од стране других аутора.^{134,372} Испитивање способности метанолног и етанолног екстракта *S. hortensis* да смање степен оксидације сојиног уља показало је да ови екстракти инхибирају и примарну и секундарну оксидацију сојиног уља током стајања, а добијене вредности су приближне онима добијеним у оквиру наших истраживања. Исто тако, наведени екстракти испољавају и висок степен инхибиције оксидације линолне киселине у систему β-каротен/линолна киселина (74% за етанолни и 87,5% за метанолни екстракт).³⁷³ Обогаћивање уља ацетонским и етанолним екстрактом чубра доприноси њиховој термалној стабилности приликом загревања на 180 °C. Оба екстракта су поседовала висок садржај рузмаринске киселине, док је етанолни екстракт квантитативно садржао већи проценат фенолних компонената у односу на ацетонски. Ипак, израженији ефекат на нивоу стабилности уља примећен је у мање поларном, ацетонском екстракту, на основу чега је изведен закључак да је овај ефекат последица присуства специфичних потентних једињења, а не пропорционалан укупној количини фенолних једињења.³⁷⁴ Слично, Dorman и Hiltunen³⁷² су нагласили да је у испитиваним екстрактима веома мала количина флавоноидних једињења, те да она не могу фигурирати у антиоксидативној активности у мери у којој се то претпоставља да чини рузмаринска киселина.

Познато је да рузмаринска и елагинска киселина, као и нарингенин, испољавају снажна антиоксидативна деловања и то пре свега на нивоу неутрализације слободних радикала. Резултати добијени у овој дисертацији су у сагласности са доступним литературним подацима, који су показали да елагинска киселина у концентрацији од 30 $\mu\text{g/mL}$ испољава око 85% инхибиције DPPH $\cdot$, док у истој концентрацији БХТ доводи до неутрализације 58% радикала.³⁷⁵ Анализом односа између структуре молекула и његове биолошке активности примећено је да су за антиоксидативну активност елагинске киселине одговорне орто-дифенилне групе, које доприносе стабилизацији радикалске форме.³⁷⁶ Са друге стране, антиоксидативни потенцијал рузмаринске киселине, као и других хидроксициметних киселина резултат је постојања четири хидроксилне групе, које су везане за два ароматична прстена, и које су способне да донирају H $\cdot$ и хелирају метале.³⁷⁷ Скорашња истраживања показала су да нарингин и његов агликон нарингенин поседују потенцијал за неутрализацију хидроксил и супероксид радикала, као и да спречавају процес оксидације липида.³⁷⁸ Као основна детерминанта антиоксидативне активности флавоноида наводи се присуство орто-катехол групе на Б прстену, која поседује способност донирања електрона (чиме се објашњава изражена способност катехина да неутралише слободне радикале), док је за антиоксидативну активност флавоноида који у својој структури не поседују катехол групу (попут кемферола) пресудна C2-C3 незасићена веза, као и хидроксилна група у положају 3.³⁷⁹

Како су биљни екстракти комплексне смеше једињења различитих структура и хемијских особина, постоји могућност синергистичког или антагонистичког деловања компонената смеше и модулирања биолошког одговора, те стога треба проценити у којој мери најзаступљеније компоненте доприносе специфичној активности. С тим у вези, активности екстраката поређене су са референтним фенолним једињењима, елагинском киселином и катехином, као и синтетским антиоксидантом БХТ. Добијени резултати су у складу са резултатима добијеним у студијама других аутора, у којима се наводи да постоји корелација између садржаја фенолних једињења и антиоксидативне активности. Trouillas и сар.⁸⁴ су показали да је активност на нивоу DPPH радикала у линеарној корелацији са фенолним профилем екстракта *A. vulgaris*. На изражену корелацију између „скевинцер“ способности на нивоу ABTS радикала и фенолног профила *A. vulgaris*, указано је и у студији Kiselove и сар.⁸⁵ Поред тога, вирак је показао и веома ниске IC₅₀ вредности на нивоу супероксид и хидроксил радикала. Међутим, претходно поменути аутори⁸⁴ су показали да у ова два теста није постојала изражена корелација између испољеног ефекта и хемијског састава, објашњавајући да разлог за овакве резултате може бити узрокован

хетерогеним једињењима присутним у екстракту и чињеницом да њихово деловање може бити резултат комплекснијих механизма, а не искључиво „хватања“ слободних радикала.

На основу резултата *in vitro* испитивања антиоксидативне активности екстраката, може се са сигурношћу констатовати да тестирани екстракти поседују изузетан потенцијал као ресурси једињења са антиоксидативним деловањем. Овакви резултати дају повода да се биљке вирак и чубар узму у разматрање као могући индустријски конзерванси, чиме би се допринело смањењу примене синтетичких антиоксиданата, за које је доказано да испољавају негативно деловање на људски организам. Поред наведеног, *A. vulgaris* и *S. hortensis* могу бити примењени и као компоненте чајних мешавина или препарата који би били коришћени у превентивне и терапеутске сврхе, са циљем редуковања патолошких стања организма, која су последица генерисања оксидативног стреса у ткивима.

5.4. Антимикробна активност

Антимикробна активност метанолних екстраката надземних делова *A. vulgaris* и *S. hortensis* и корена *A. vulgaris* испитивана је на 9 сојева бактерија, 9 сојева гљива и једном квасцу, применом микродилуционе методе.

5.4.1. Антибактеријска активност

Антибактеријска активност испитивана је на пет Грам негативна (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter chroococcum*) и четири Грам позитивна соја бактерија (*Micrococcus lysodeikticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus mycoides*). Минималне концентрације екстраката које доводе до инхибиције раста бактерија поређене су са референтним фенолним једињењима, елагинском киселином и катехином, као и антибиотицима хлорамфениколом и еритромицином. Добијени резултати представљени су у оквиру Табеле 12, а добијене МИК вредности изражене су у mg/mL.

За тумачење добијених МИК вредности примењена је скала коју је предложио Kuete³⁸⁰, а која сугерише да се екстрактима са израженом антимикробном активношћу могу сматрати они који показују МИК вредности ниже од 0,1 mg/mL, док су умерено активни екстракти чије су МИК вредности у распону од 0,1 до 0,625 mg/mL. Свака концентрација екстракта која превазилази ове вредности сматра се високом, а активност

екстракта се означава као слаба или занемарљива. Базирајући се на оваком приступу, на основу резултата антибактеријске активности екстракта, може се закључити да екстракти испољавају умерену до слабу антибактеријску активност на већини тестираних бактерија. Вредности очитане за минималне инхибиторне концентрације за АВН крећу се у распону од 0,156 - 5 mg/mL, односно 0,156-10 mg/mL за АВК и СХН. Најрезистентнији бактеријски сојеви су биле три Грам негативне бактерије: *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. chroococcum*, којима испитивани екстракти спречавају раст у веома високим концентрацијама (2,5 - 10 mg/mL). Са друге стране, као сојеви који су најсензитивнији на деловање екстракта показали су се *M. lysodeikticus* (МИК=0,156 mg/mL за АВН и АВК, односно 0,3125 mg/mL за СХН) и клинички изоловани сој *B. mycoides* (МИК=0,625 mg/mL за АВН; 0,156 mg/mL за АВК и СХН). Поред ова два соја, и *S. typhimurium* (МИК=0,625 mg/mL за АВН и АВК и 5 mg/mL за СХН) и *E. faecalis* (МИК=0,625 mg/mL за АВН, 0,156 АВК и 2,5 mg/mL за СХН) су показали висок степен осетљивости на деловање тестираних екстракта.

Табела 12. Антибактеријска активност екстракта надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis*, референтних фенолних једињења-елагинске киселине и катехина, антибиотика хлорамфеникола и еритромицина.

Сој бактерија	МИК вредности (mg/mL)					МИК вредности (µg/mL)	
	Екстракти			Стандардна једињења		Референтни антибиотици	
	АВН	АВК	СХН	ЕК	К	ХЛ	ЕР
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> (ATCC 4698)	0,156	0,156	0,312 5	0,5	>1	1,25	20
<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	0,625	0,625	5	0,5	0,5	>20	20
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	2,5	1,25	10	0,25	0,5	>20	10
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	0,625	0,156	2,5	0,031	>1	20	1,25
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	1,25	1,25	5	>1	>1	20	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 70063)	5	10	5	>1	>1	20	>20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	2,5	5	10	1	1	>20	20
<i>Bacillus mycoides</i> (FSB 1)	0,625	0,156	0,156	0,016	>1	20	1,25
<i>Azotobacter chroococcum</i> (FSB 14)	5	2,5	2,5	0,031	>1	10	20

Легенда: ЕК - елагинска киселина; К - катехин; ХЛ - хлорамфеникол; ЕР - еритромицин.

Када је реч о патогеној *E. coli*, установљено је да оба тестирана екстракта вирка

испољавају јаче деловање (МИК=1,25 mg/mL) у односу на екстракт чубра (МИК=5 mg/mL). Сличност са овим резултатима уочена је и на нивоу соја *B. subtilis*, за који је примећено да екстракт корена вирка испољава најјачу активност (1,25 mg/mL), док су екстракти надземних делова вирка и чубра слабије деловали (2,5 mg/mL за АВН и 10 mg/mL за СХН). Ипак, узимајући у обзир прилично високе вредности за минималне инхибиторне концентрације, може се сматрати да испитивани екстракти показују веома слабо или готово занемарљиво антибактеријско деловање на нивоу ова два соја. Како би се извршила упоредна анализа антибактеријске активности сва три екстракта, извршено је њихово поређење на основу очитаних МИК вредности и сојева бактерија на чији раст показују инхибиторно деловање. Компаративном анализом установљено је да екстракти АВН и АВК показују МИК вредности веће од 0,625 mg/mL за пет истоветних сојева бактерија, док СХН показује те вредности на седам тестираних сојева. Са друге стране, АВН показује умерену антимикробну активност (0,1 - 0,625 mg/mL) на три соја, СХН на два, да би се екстракт корена вирка у овом случају показао као најактивнији, инхибирајући раст три соја бактерија у концентрацији нижој од 0,625 mg/mL). Сходно наведеној компарацији, могао би се извести закључак да се екстракт корена вирка, у односу на друга два екстракта, показао као најефикаснији.

Када је реч о одабраним референтним фенолним једињењима, елагинској киселини и катехину, уочава се веома слаба активност раствора катехина, са МИК већом од 1 mg/mL за већину бактерија. Супротно томе, елагинска киселина је показала ниже минималне инхибиторне концентрације већ при 0,016 mg/mL за *B. mycoides*, односно 0,031 mg/mL за *E. faecalis* и *A. chroococcum*. Када је реч о овим сојевима бактерија, важно је истаћи да су добијене концентрације знатно ниже од оних примећених за тестиране екстракте. Насупрот томе, сви испитивани екстракти су се показали ефикаснијим у спречавању раста *M. lysodeikticus* у односу на стандардна фенолна једињења.

Ипак, поређењем са антибиотицима хлорамфениколом и еритромицином, установљено је да ни један од тестираних екстраката нити фенолних једињења не превазилази активност антибиотика на свим испитиваним сојевима бактерија (МИК (антибиотик) = 1,25 - 20 µg/mL).

5.4.2. Антифунгална активност

Како би се испитало да ли екстракти *A. vulgaris* и *S. hortensis* поседују способност инхибиције раста фунгалних врста, примећено је девет сојева плесни (*Aspergillus*

brasiliensis, *Phialophora fastigiata*, *Penicillium canescens*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata* и *Doratomyces stemonitis*) и један квасац (*Candida albicans*), а резултати су приказани у оквиру Табеле 13.

Табела 13. Антифунгална активност екстракта надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis*, референтних фенолних једињења-елагинске киселине и катехина, антимицотика кетоконазола и нистатина.

Сој гљива	МИК вредности (mg/mL)					МИК вредности (µg/mL)	
	Екстракти					Стандардна једињења	Референтни антимицотици
						КЕ	Н
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404)	20	>20	2,5	>1	>1	20	5
<i>Phialophora fastigiata</i> (FSB 81)	10	20	5	>1	>1	5	1,25
<i>Penicillium canescens</i> (FSB 24)	20	20	2,5	0,25	>1	2,5	2,5
<i>Trichoderma viride</i> (FSB 11)	>20	20	10	1	>1	5	0,625
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (FSB 13)	>20	20	10	>1	>1	2,5	0,625
<i>Aspergillus glaucus</i> (FSB 32)	5	10	5	1	>1	1,25	5
<i>Fusarium oxysporum</i> (FSB 91)	10	20	10	1	>1	5	2,5
<i>Alternaria alternata</i> (FSB 51)	20	>20	20	>1	>1	5	0,625
<i>Doratomyces stemonitis</i> (FSB 41)	2,5	5	10	>1	>1	10	2,5
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10259)	>20	>20	10	>1	>1	>20	0,625

Легенда: ЕК - елагинска киселина; К - катехин; КЕ - кетоконазол; Н - нистатин.

Резултати су показали да су сви тестирани екстракти недовољно активни у спречавању раста гљивица и њихов инхибиторни ефекат се испољава тек при веома високим концентрацијама (2,5 - 20 mg/mL). Као најотпорнија врста показала се *A. alternata*, будући да екстракти једино у највишој апликованој (20 mg/mL) или чак и вишој концентрацији показују инхибиторно деловање на раст овог соја. Са друге стране, најниже ефективне концентрације екстракта (иако и даље веома високе; МИК = 2,5 - 10 mg/mL) запажене су у случају *A. glaucus* и *D. stemonitis*. Управо на нивоу *D. stemonitis* и екстракт надземног дела и корена вирка показују активност у најнижој концентрацији (2,5 и 5 mg/mL). Када је реч о СХН, најосетљивијим су се показале *A. brasiliensis* и *P. canescens*, којима је раст инхибиран применом овог екстракта у концентрацији 2,5 mg/mL.

Изузев на *P. canescens* (МИК=0,25 mg/mL), елагинска киселина није испољила значајне инхибиторне ефекте на нивоу других плесни нити на врсту *C. albicans*, а чак је за већину гљива МИК вредност превазилазила највишу тестирану концентрацију. Такође, резултати показују да катехин примењен у највишој концентрацији (1 mg/mL) не спречава раст ни једне од тестираних врста гљивица.

Са друге стране, антимицити кетоконазол и нистатин у знатно нижим концентрацијама инхибирају раст гљивица (МИК=0,625 - 20 µg/mL), при чему треба истаћи да се нистатин показао ефикаснијим на тестираним врстама гљива, узимајући у обзир ниже минималне инхибиторне концентрације. Упоредном анализом ових података са МИК вредностима очитаним за екстракте и стандардна фенолна једињења, уочено је да се њихова активност не може поредити са деловањем антимицотика, те да се сходно томе може сматрати да изложеност гљивица наведеним концентрацијама екстракта и стандарда води изостанку инхибиторног ефекта на раст плесни.

Антибактеријска активност надземног дела *A. vulgaris* одређена у овој дисертацији у великој мери је у складу са резултатима добијеним у истраживањима спроведеним од стране других истраживачких тимова. Умерена антимикробна активност етанолног екстракта *A. vulgaris* забележена је у другим студијама.^{381,382}

У студији која је обухватала 13 бактерија, све су се показале резистентним на присуство воденог екстракта *A. vulgaris* (МИК > 1 mg/mL), изузев *Staphylococcus* spp. (МИК=0,125 - 0,75 mg/mL), што потврђују и наши резултати, указујући тиме на већу осетљивост Грам позитивних бактерија у односу на Грам (-) врсте.³⁸³ Како закључују аутори поменутог истраживања, количина танина у узорцима је једна од најважнијих варијабли које одређују степен антибактеријске активности. Тиме се парцијално могу објаснити релативно ниже инхибиторне концентрације екстракта корена вирка у нашем експерименту, у којем је одређена већа концентрација катехина, кључног једињења у формирању танинских структура, у односу на надземни део биљке. Претпоставља се да катехини антибактеријско деловање остварују путем нарушавања интеграције мембране бактеријске ћелије везивањем за липидни двослој и инактивацијом или инхибицијом интра- и екстрацелуларних ензима. Смањење липидног двослоја примећено је и приликом излагања бактеријске ћелије рутину, тилирозиду и кверцетину, који су заступљени и у испитиваним екстрактима.³⁸⁴

Поред тога, важно је напоменути да су на фенолна једињења и биљне екстракте богате њима мање осетљиве Грам негативне бактерије. Посматрајући све тестиране бактерије у оквиру наше студије, стиче се утисак да су све четири Грам позитивне

бактерије примењене у овом експерименту далеко осетљивије на присуство екстраката у односу на Грам негативне. За разлику од Грам-(+) бактерија, Грам-(-) врсте у својој структури поседују и липополисахаридни слој и порине у спољашњој мембрани, који представљају својеврсну баријеру у интрацелуларној пенетрацији антибиотика, те је сходно томе и разумљиво да су ове бактерије мање осетљиве на антибактеријске компоненте.

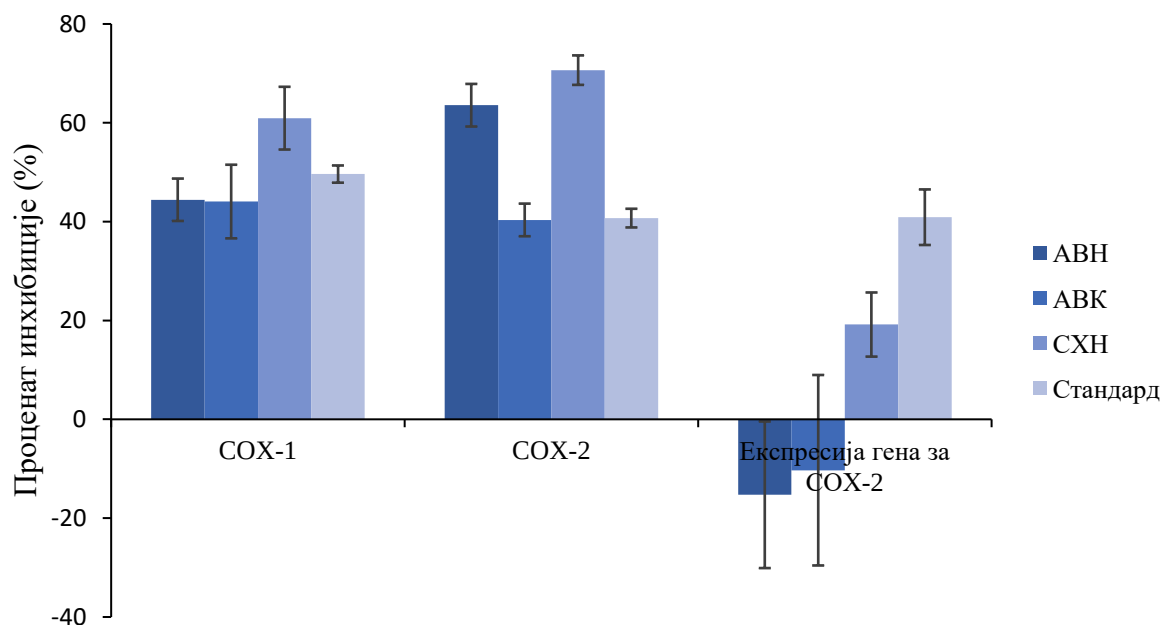
За разлику од етарског уља, које је хемијски окарактерисано и чија је снажна активност на инхибицију раста микроорганизама позната, веома мали број литературних података се односи на различите екстракте *S. hortensis* са циљем одређивања присуства антимикуробних компонената. Најсвеобухватнија студија спроведена је на широкој лепези микроорганизама (укупно 178 сојева микроорганизама, од којих је 55 врста бактерија, 1 квасац и 4 гљиве).¹²² Применом диск дифузионе и микродилуционе методе показано је да хексански екстракт надземног дела чубра не показује антибактеријску активност, изузев на 3 *Bacillus* соја (*B. sphaericus*, *B. amyloliquefaciens* и *B. megaterium*) са максималном зоном инхибиције 7 - 9 mm, односно МИК вредношћу од 31 - 125 µL/mL. Нешто бољим се показао метанолни екстракт, који је, осим ефекта на поједине *Bacillus* сојеве, показивао и инхибиторни ефекат на раст шест изолата *C. albicans* (7-9 mm), затим на *E. coli*, *Kocuria varians*, *Micrococcus luteus* и *Pantoea agglomerans*, и то у пречницима од 6 - 13 mm, док су се минималне инхибиторне концентрације кретале у распону од 15,60 до 250 µg/mL. На нивоу плесни, ни хексански, као ни метанолни екстракт нису показали инхибицију раста *A. alternata*, *A. flavus*, *F. oxysporum* и *Penicillium* spp, што је у сагласности са резултатима у овој тези. Слаба антибактеријска активност екстраката *S. hortensis* уочена је и на нивоу биљних патогена којима је инокулирано семе парадајза и зелене салате.³⁸⁵ У поменутој студији запажено је да је хексански екстракт показао бољу активност у односу на метанолни, пре свега захваљујући присуству велике количине карвакрола (~60%). Међутим, комбинована примена ова два екстракта у концентрацији 2,5 mg/mL доводи до приметног смањења заразе семена салате, праћено повећањем клијавости семена, те је указано на могућност примене ових екстраката као дезинфекционог средства у пољопривредне сврхе.

Испитивање антимикуробне активности често је повезано са проценом могућности за продужења рока трајања и хигијенске исправности намирница. Неке од најчешћих патогена у храни, а нарочито у сиревима, су *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. и *Staphylococcus aureus*. Фортификација сира етанолним екстрактом *S. hortensis* значајно побољшава сензорне карактеристике свежег крављег сира, међутим, његов додатак не спречава раст *S. aureus*.¹¹⁸

5.5. Антиинфламаторна активност

Ензими циклооксигеназе (COX-1 и COX-2) представљају неке од кључних фактора у инфламаторним процесима. Њихова улога се огледа у преводу полинезасићене арахидонске киселине у ендопероксид простагландин G_2 , који се брзо редукује до простагландина H_2 , који представља прекурсор бројних биолошки значајних простаноида, међу којима је и простагландин E_2 . У оквиру ове дисертације испитана је супресија активности циклооксигеназе-1 и -2 у присуству екстраката мерењем количине производа - PGE_2 , насталог из арахидонске киселине, а добијени резултати инхибиције ова два ензима, као и утицаја екстраката на експресију гена за COX-2 представљени су на Слици 28.

У погледу инхибиције циклооксигеназе-1, екстракти АВН и АВК су показали готово идентичну активност (44,43 и 44,07%). У истој концентрацији (50 $\mu\text{g/mL}$), екстракт СХН се показао као супериорнији, инхибирајући продукцију PGE_2 за 60,94%. Као референтно једињење коришћен је индометацин, један од најпотентнијих инхибитора COX-1. На нивоу COX-1, индометацин, апликован у концентрацији 0,45 $\mu\text{g/mL}$, показује готово исти ниво инхибиције као и екстракти АВН и АВК (49,63%).



Слика 28. Инхибиторни ефекат екстраката АВН, АВК и СХН, као и референтних једињења (базирајући се на подацима из студије³⁸⁶: индометацин (0,45 $\mu\text{g/mL}$) за COX-1, NS-398 (1,57 $\mu\text{g/mL}$) за COX-2 и дексаметазон (0,98 ng/mL) - експресија гена за COX-2).

Када је реч о циклооксигенази-2, ензимским имуноесејем је показано да су највиши проценат инхибиције овог ензима показали екстракти АВН и СХН, који у концентрацији

50 µg/mL доводе до 63,56%, односно 70,66% супресије ензимске активности. NS-398 (N-(2-циклохексилокси-4-нитрофенил) метансулфонамид) је један од најраније идентификованих селективних инхибитора COX-2 изоформе.³⁸⁷ Његова примена у веома ниској концентрацији (1,57 µg/mL) узрокује знатно смањење активности COX-2 у *in vitro* условима (40,72%).

Како су сва три испитивана екстракта показала да у извесној мери узрокују смањење ензимске активности на нивоу циклооксигеназа 1 и 2, даљи ток у нашим истраживањима подразумевао је испитивање механизма остваривања инхибиторног ефекта на нивоу експресије COX-2. У те сврхе, у активираним макрофагима миша (RAW264.7 ћелијска линија), једним од кључних елемената у одговору на запаљенску реакцију³⁸⁸, индукована је инфламација липополисахаридом, чија се улога огледа у продукцији и ослобађању проинфламаторних цитокина путем MAPK (серин/треонин специфичне протеин киназе) и Nf-κB сигналних путева.³⁸⁹ Експресија гена за COX-2 регулисана је транскрипционим фактором Nf-κB. Резултати наших истраживања показали су да од три испитивана екстракта, једино екстракт надземног дела *S. hortensis* утиче на смањење експресије гена за COX-2 путем нарушавања Nf-κB сигналног пута (19,18%). Међутим, оба екстракта *A. vulgaris* показују негативне вредности за овај параметар, те стога може да се закључи да се инхибиторни ефекат на нивоу COX-2 остварује путем другог механизма, а не деловањем на експресију гена за ензим путем Nf-κB. Очекивано, неупоредиво већи проценат инхибиције експресије гена путем редукције Nf-κB у односу на тестиране екстракте показао је дексаметазон (40,90%).

Прегледом досадашњих литературних података, установљено је да је *in vitro* антиинфламаторна активност на циклооксигеназама за екстракте надземног дела *A. vulgaris* и *S. hortensis* и екстракт корена *A. vulgaris* по први пут испитивана у овој дисертацији. Када је у питању биљка *A. vulgaris*, једина студија која се дотакла ове биолошке активности обухватала је испитивање утицаја 16 различитих екстраката на супресију активности арахидонат 15-липоксигеназе.⁸⁴ Међу екстрактима тестираним у споменутом истраживању, посебно су се издвојили екстракти *Filipendula ulmaria*, *A. vulgaris* и *Rosmarinus officinalis*, будући да је концентрација која инхибира 50% активности ензима за ове екстракте била више него двоструко нижа у односу на остале узорке (IC₅₀ = 0,46, 0,52 и 0,65 mg/mL). Добра корелација примећена је између инхибиторног ефекта на 15-LOX и неутрализације DPPH и супероксид радикала, а индиректно и количине фенолних једињења, што доприноси закључку да су управо ове компоненте одговорне за антиинфламаторну и за антиоксидативну активност

испитиваних екстраката. Иако изостају тестови у *in vitro* условима, антиинфламаторна активност полифенолне фракције *S. hortensis* у концентрацији 1000 mg/kg испитивана је *in vivo*, а добијени резултати показују да се апликацијом овог екстракта значајно редукује оток шапе пацова изазван карагенаном.³⁹⁰ Сходно досадашњим сазнањима, може се претпоставити да је за евидентирани инхибицију експресије гена за COX-2 путем Nf-κB сигналног пута од стране екстракта *S. hortensis* одговорна рузмаринска киселина³⁹¹, јер је показано да се њено антиинфламаторно деловање остварује путем супресијом проинфламаторног сигнала Nf-κB у инфламаторном процесу индукованом липополисахаридом.³⁹²

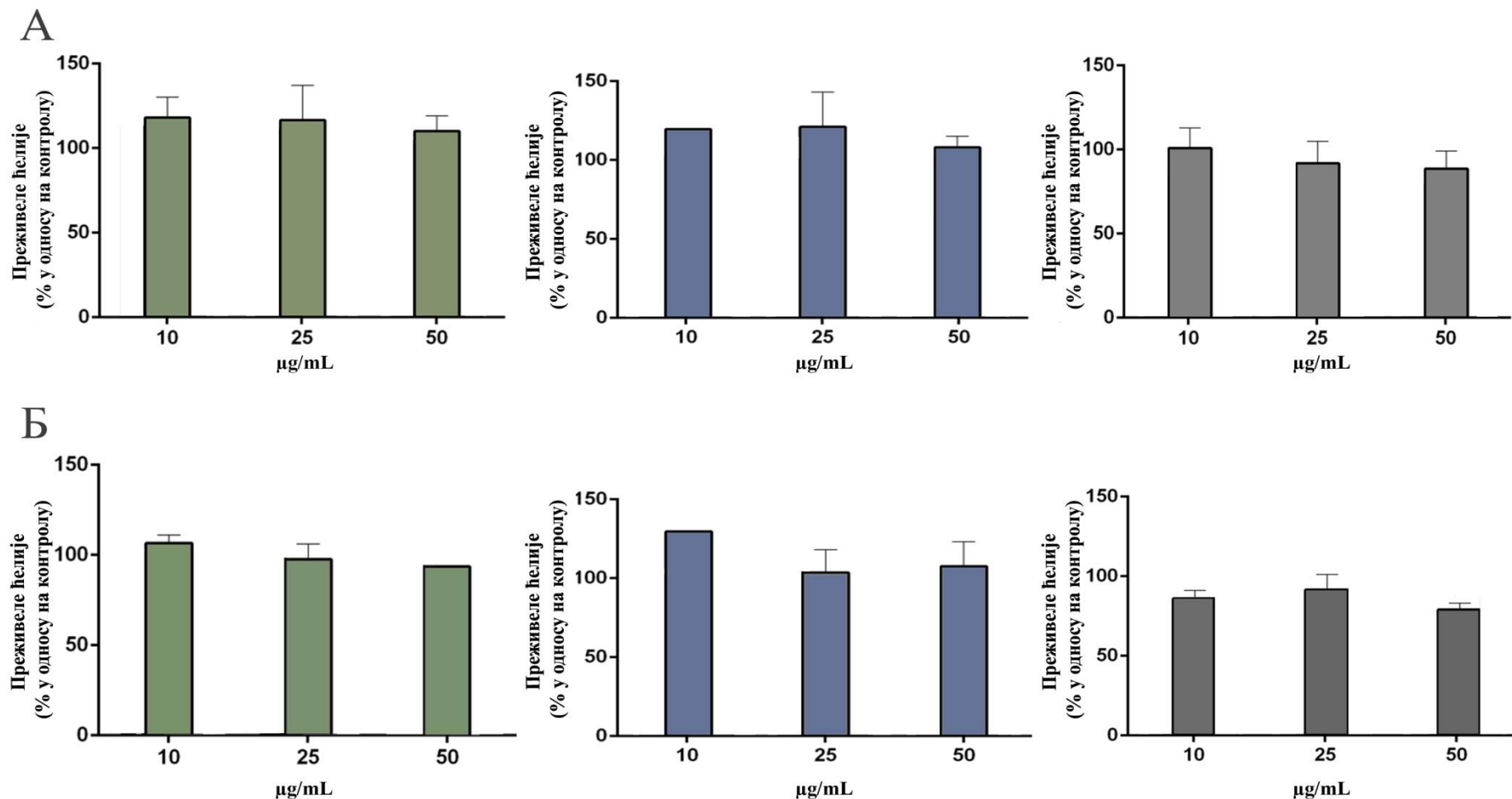
Висок проценат инхибиције циклооксигеназа деловањем екстраката АВН, АВК и СХН могуће је објаснити увидом у фитохемијски профил ових биљака. Досадашње студије недвосмислено указују да постоји снажна корелација између количине фенолних једињења: флавоноида, циметних киселина, танина и антоцијана и изражене антиинфламаторне активности, првенствено захваљујући њиховој антиоксидативној активности.^{393,394} Хидроксициметне киселине - кафеинска, ферулна и синапинска киселина показују висок степен инхибиције COX-2 путем механизма који обухватају инхибицију специфичних киназа, супресију Nf-κB, модулирањем цитокина и проинфламаторних медијатора.^{395–397} У *in vivo* студији спроведеној од стране Ghorbanzadeh и сар.³⁹⁸, показано је да интраперитонеална апликација елагинске киселине редукује оток шапе миша изазван карагенаном и то инхибирањем активности COX-2 и последично, смањеним формирањем PGE₂, и то у вредностима упоредивим са референтним једињењем, индометацином. Прецизнији механизми испољавања противзапаљеног деловања представљени су за флавоноиде. На нивоу COX-2, међу најактивнијим флавоноидима налазе се једињења који садрже катехол групу у прстену Б, попут апигенина и лутеолина идентификованих у мањој мери у нашим екстрактима. Инхибиторно деловање флавоноида на нивоу COX-2 одиграва се усмеравањем молекула ка хидрофобном цепу COX-2, једном од три активна места овог ензима, где се формира водонична веза између 3',4'-дихидроксилних група флавоноида и тирозина (Tyr³⁵⁵) и серина (Ser⁵³⁰), при чему долази до супресије активности циклооксигеназе-2. Супротно томе, флавоноиди који у својој структури садрже мање супституената показују знатно већи степен инхибиције COX-1. Разлог за овакво деловање лежи у чињеници да је активни центар COX-1 релативно мали, услед чега није доступан комплекснијим молекулским структурама.³⁹⁹

5.6. Биокомпатибилност екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis*

Један од првих корака у евалуацији сигурности употребе биљних екстраката подразумева тестове цитотоксичног деловања на ћелијама, како би се процениле евентуалне токсичне резидуе. Када је реч о биокомпатибилности, важно је истаћи да екстракти, поред одсуства токсичног ефекта, могу испољити ефекат убрзане пролиферације ћелија у циљу смањења неког оштећења.³⁴⁷ Ови тестови су такође значајни и са аспекта будућих истраживања у *in vivo* условима, како би се предупредили и смањили сви ризици примене биљних екстраката на експерименталним животињама.⁴⁰⁰ У оквиру ове дисертације, биокомпатибилност екстраката надземног дела *A. vulgaris* и *S. hortensis* и корена *A. vulgaris* испитивана је путем МТТ теста којим се процењује вијабилност ћелија и то на ћелијским линијама хуманих кератиноцита (HaCaT) и фибробласта миша (Balb/3T3). Кератиноцити представљају главне ћелије површинског слоја коже са примарном улогом заштите коже од патогена и инфекција. Заједно са фибробластима, кератиноцити представљају главне ћелије које учествују у процесу регенерације оштећеног ткива. Њихова пролиферација стимулисана је инфламаторним процесом, након чега се успостављају двоструке паракрине петље између ове две врсте ћелија са крајњим циљем бржег зарастања ране, реепитализације ткива и поновног успостављања хомеостазе коже.⁴⁰¹ Резултати МТТ теста су изражени као проценат преживелих ћелија које су третиране различитим концентрацијама екстраката у односу на контролни узорак након 72 сата, а хистограми су представљени на *Слици 29*.

На основу представљених резултата могуће је констатовати да екстракт надземног дела *A. vulgaris* показује потпуну биокомпатибилност са ћелијама коже, фибробластима и кератиноцитима, будући да је примећено да не долази до смањења броја ћелија ни са једном од примењених концентрација (10, 25 и 50 µg/mL), те да изостају токсични ефекти, што овај екстракт може сврстати у безбедне у предложеним дозама.

Истоветан модел запажен је и у случају екстракта корена *A. vulgaris*, где све тестиране концентрације показују потпуну компатибилност са тестираним ћелијама, одржавајући или благо повећавајући број ћелија.



Слика 29. Биокompatibilност екстракта надземног дела *A. vulgaris* (ABH, зелени хистограм), корена *A. vulgaris* (ABK, плави хистограм) и надземног дела *S. hortensis* (СХН, сиви хистограм) са ћелијским линијама хуманих кератиноцита NaCaT (А) и фибробласта миша Balb/3T3, клон А31 (Б), изражена у процентима преживелих ћелија у односу на контролу након 72 сата. Резултати су представљени као средња вредност два мерења $\pm$ стандардна грешка мерења.

Када је реч о екстракту надземног дела *S. hortensis*, примећен је благи пад у броју ћелија након 72 сата и то у највишој тестираној дози за обе ћелијске линије. Исто тако, незнатно смањење броја ћелија запажено је на нивоу фибробласта миша приликом апликације преостале две концентрације екстракта (10 и 25 $\mu\text{g/mL}$) и на нивоу кератиноцита, у концентрацији 25 $\mu\text{g/mL}$. Ипак, одржавање броја вијабилних хуманих кератиноцита уочено је при концентрацији СХН од 10 $\mu\text{g/mL}$. Овакав резултат указује да екстракт надземног дела *S. hortensis* може испољити незнатни цитотоксични ефекат на здравим ћелијама коже, међутим овај екстракт се и даље сматра биокompatibilним, јер је проценат преживелих ћелија третираних екстрактом виши од 80% и није примећена статистички значајна разлика између контролног узорка и третираних ћелија ($p>0,05$).

На представљеним хистограмима, уочава се већи број преживелих ћелија у односу на контролни узорак. Ова појава је најизраженија за екстракте *A. vulgaris*, који у готово свим апликованим концентрацијама и на обе ћелијске линије узрокују повећање броја ћелија. Овакав резултат је могуће тумачити са аспекта поспешене пролиферације ћелија коже у присуству екстракта *A. vulgaris*, узимајући у обзир да је једна од традиционалних употреба вирка везана управо за примену у третирању рана, где долази до изражаја способност брзе регенерације ткива приликом оштећења.^{88,361} Ипак, повећање броја ћелија евидентирано МТТ тестом не мора нужно бити условљено увећаном пролиферацијом, нарочито када су вредности које доводе до одступања у њиховом броју свега 10 до 20% више у поређењу са контролом, као што је то запажено у овом експерименту. У поменутим случајевима, не треба пренебрегнути могућност да поједине компоненте екстракта, попут кверцетина, интерферирају са МТТ реагенсом редукујући га до формазана. Како су екстракти комплексне смеше великог броја једињења различитих структура и механизма деловања, могуће је да се остварују интеракције са митохондријалним дехидрогеназама, које су одговорне за редукцију тетразолијумове соли, те да воде њиховој активацији или инхибицији, што се уочава као повећање, односно смањење количине насталог формазана, интерпретирано преко броја вијабилних ћелија, иако није било суштинског ефекта екстракта на раст и вијабилност ћелије.⁴⁰²

Подаци о антипролиферативној и цитотоксичној активности екстракта вирка и чубра су веома оскудни у доступној научној литератури. Као што је поменуто, испитивање биопотенцијала етарског уља чубра и других врста рода *Satureja* заступљено

је у далеко већој мери него што је то случај са екстрактима надземног дела биљке. У студији спроведеној на више ћелијских линија канцера установљено је да етарско уље *S. sahendica* редукује вијабилност канцер ћелија (MCF-7, Vero, JET 3 и SW480) при веома ниским IC_{50} вредностима (15,6-250 $\mu\text{g/mL}$).⁴⁰³ Супротно томе, Ћетојевић-Simin и сар.⁴⁰⁴ су показали да екстракти ртањског чаја (*S. montana*) различите поларности не доводе до 50% смањења раста ћелија естроген-зависног аденокарцинома дојке (MCF-7) чак ни при концентрацијама вишим од 1 mg/mL , спекулишући при томе да овакав резултат може бити последица присуства изофлавоноа који, делујући као фитоестрогени у малим концентрацијама, стимулишу пролиферацију ових ћелија. Ћелије канцера грлића материце (HeLa) биле су најосетљивије на деловање екстракта *S. montana*. Међутим, показано је да хлороформски и петролетарски екстракт доводе до инхибиције раста ћелија канцера дебелог црева (HT-29) при IC_{50} концентрацијама око 0,74 mg/mL .⁴⁰⁴ Са друге стране, истраживања су показала да рузмаринска киселина, једно од доминантних једињења у роду *Satureja* не инхибира пролиферацију, али индукује процес апоптозе у ћелијама колоректалног канцера (HCT15 и CO115).⁴⁰⁵ Досадашње студије су показале да рузмаринска киселина у веома ниским концентрацијама испољава цитотоксичну активност према широкој лепези ћелијских линија канцера (канцер дебелог црева, јајника, јетре, дојке, простате и других) и то путем механизма који укључују антиинфламаторни и антиоксидативни одговор, инхибицију пролиферације ћелија, као и индуковање процеса апоптозе.⁴⁰⁶

У јединој студији која се дотакла испитивања цитотоксичности вирка испитивана је активност водено-алкохолног екстракта *A. vulgaris* на ћелијама меланома миша (B16). Резултати овог истраживања показали су да се супресија раста овог типа ћелија остварује при вишим концентрацијама екстракта ($IC_{50} > 0,5 \text{ mg/mL}$). Овакав одговор екстракта може бити приписан присуству елагинске киселине као доминантне компоненте екстракта, за коју је показано да значајно редукује процес меланогенезе и активност тирозиназе у B16 ћелијској линији меланома.⁴⁰⁷ Поред тога, показано је да елагинска киселина испољава антитуморско деловање и на другим ћелијама канцера путем инхибиције раста и миграције ћелија, као и другим специфичним механизмима карактеристичним за одређени тип канцер ћелија. *In vivo* експеримент спроведен са циљем процене утицаја глицеринског екстракта *A. vulgaris* на процес зацељивања ране показао је да тестирани екстракт поспешује пролиферацију епителних ћелија бубрега и јетре, као и миофибробласта, доприносећи тиме ефикаснијој регенерацији ткивне лезије.⁸⁶

Узимајући у обзир резултате претходних истраживања, као и податке о вијабилности ћелија добијене у овој дисертацији, могуће је констатовати да се јавља потреба за спровођењем нових, додатних експеримената базираних на примени различитих фракција тестираних екстраката и укључивањем већег броја ћелијских линија и других анализа за испитивање вијабилности ћелија. На овај начин би се установило да ли је повећање, односно смањење броја живих ћелија, показано у нашој студији, директна последица бенефитног ефекта главних компонената екстраката на пролиферацију нормалних ћелија или су добијени резултати последица других удружених дејстава његових компонената.

5.7. Антиоксидативни потенцијал екстраката у *in vivo* условима

Прелиминарни преглед биолошких активности екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis* извршен је у *in vitro* условима. На основу резултата ових експеримената, представљених у оквиру претходних поглавља, може се закључити да екстракти испољавају снажну антиоксидативну активност. Претходни експерименти којима је процењен антиоксидативни капацитет тестираних екстраката спроведени су у условима адаптираних лабораторијских система који понекад не осликавају стварни ефекат у реалним околностима, као што је стабилност приликом дигестије, биодоступност и интеракција са компонентама ткива. Стога је тестирање ендогених видова антиоксидативне одбране у присуству екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis* одабрано за спровођење експеримената у *in vivo* условима, а мужјаци пацова соја Wistar коришћени су као модел организми.

Цисплатина, иако је један од комерцијално најзаступљенијих хемиотерапеутика, позната је и као узрочник оксидативних оштећења на нивоу гастроинтестиналног тракта, кардиоваскуларног система и репродуктивних органа^{408,409}. Вођени обимом примене цисплатине у медицинске сврхе, лимитима њене употребе услед развијања оксидативног стреса у ткивима, као и литературним подацима коју охрабрују примену екстраката лековитог биља у сврхе смањења оксидативног стреса изазваног хемиотерапеутицима, идеја *in vivo* експеримената била је да се изведу закључци о променама које се одигравају у ткиву јетре, бубрега и тестиса применом цисплатине, као и о потенцијалу *A. vulgaris* и *S. hortensis* да спрече оксидативно оштећење у ткиву и репарирају настала оштећења.

Како би се стекао комплетнији увид у настале промене у органима, посматрани су ефекти на нивоу специфичних функционалних параметара одабраних ткива у серуму

експерименталних животиња, као и параметара оксидативног стреса у самом ткиву. Ради морфолошке потврде насталих промена, извршена је и хистопатолошка анализа ткивних сегмената након бојења хематоксилином и еозином. Како су спроведена два одвојена експеримента, један који обухвата испитивање утицаја надземних делова и корена *A. vulgaris* и елагинске киселине, и други који се бавио надземним делом *S. hortensis* и силимарина, резултати ће бити груписани у складу са дизајном експеримента у оквиру одвојених табела и слика.

5.7.1. Испитивање функционалних параметара ткива у серуму експерименталних животиња

Количина укупних протеина, укупног билирубина, активност ензима трансаминаза (ALT, AST), алкалне фосфатазе (ALP) и γ -глутамил трансферазе (γ GT) у серуму експерименталних животиња одабрани су за процену функционалности јетре. Очуваност функција бубрега мерена је путем количине урее, мокраћне киселине и креатинина у серуму, док је као параметар тестиса посматран ниво тестостерона, такође у крвном серуму.

У Табели 14 приказани су резултати испитивања утицаја метанолних екстраката надземног дела и корена *A. vulgaris* у различитим концентрацијама и елагинске киселине на параметре функције јетре, бубрега и тестиса приликом ко-третмана са цисплатином. Упечатљива повећања ($p < 0,001$) концентрације посматраних параметара и активности ензима у серуму: укупног билирубина и ензима ALT, AST, ALP и γ GT, изузев количине укупних протеина ($p > 0,001$), запажена су у групи II, која је пети дан трајања експеримента интраперитонеално примила цисплатину, у односу на физиолошки здраве животиње у контроли (I). Приказани резултати сугеришу да третман цисплатином изазива драстичне промене на нивоу јетре, које се манифестују повећањем активности ензима у серуму. Када је јетра физиолошки здрава, поменути ензими су присутни у цитоплазми хепатоцита и/или њиховим митохондријама. Излагање јетре деловању цисплатине узрокује оксидативна оштећења ткива услед немогућности ендogene антиоксидативне одбране да спречи стварање слободних радикала и инхибира липидну пероксидацију. Као последица ових промена, долази до метаболичких промена унутар јетре и до нарушавања структуре мембране хепатоцита, што води ослобађању ензима у крвоток. У стањима акутног оштећења јетре повишене су вредности трансаминаза ALT и AST у крви. Њихов однос, такозвани Де Ритис коефицијент, директно указује на

етиологију оштећења јетре, тј. да ли је хепатичка функција нарушена услед вирусног хепатитиса, масне јетре или других патолошких стања.^{410,411} Када је реч о нивоу ALP, GGT и билирубина, битно је напоменути да повећање нивоа ових параметара у серуму доста говори не само о нарушеној функцији јетре, него и о застоју у отицању жучи и нарушеној хомеостазии целокупног хепатобилијарног система.⁴¹² Како је једна од улога јетре и одвијање метаболизма протеина, могло би се претпоставити да ће приликом оштећења јетре бити нарушен и ниво укупних протеина одређених у серуму. Ипак, у нашој студији ниво протеина у групама третираним цисплатином и контролној групи није значајно промењен, што указује на то да се алтерације овог параметра дешавају у стањима хроничног и озбиљнијег оштећења јетре. Ко-третман са елагинском киселином (III) и екстрактима АВН и АВК у три дозе (50, 100 и 200 mg/kg т.м.) показује тенденцију ублажавања ефеката цисплатине на јетру, снижавајући вредности свих параметара ка вредностима ближим контролној групи. Ипак, овакав ефекат није дозно зависан. Конкретније, доза од 100 mg/kg АВН показује се као ефикаснија на нивоу ензима ALT и ALP у поређењу са друге две тестиране дозе, иако међу њима није примећена статистички значајна разлика у активности ензима ($p > 0,001$). Са друге стране, на нивоу AST, смањење је уочено за највишу дозу (200 mg/kg) оба екстракта (групе VI и IX), односно најнижу (50 mg/kg) у случају γ GT. Важно је истаћи да апликација екстраката АВН и АВК *per se*, у одсуству третмана цисплатином, показује вредности сличне контроли ($p > 0,001$), изузев нешто виших вредности за AST ($p < 0,01$) и γ GT ($p < 0,05$) у односу на контролу, чиме се указује да екстракти примењени самостално у највишој тестираној дози ипак могу изазвати блажи утицај на функцију јетре и да примена ових екстраката може бити најефикаснија у дозама до 200 mg/kg.

Нарушавање нормалне реналне функције један је од првих показатеља токсичности цисплатине.²⁹¹ Како би се проценило физиолошко стање бубрега, у серуму експерименталних животиња испитивани су нивои мокраћне киселине, урее и креатинина. Вредности ових параметара су знатно увећане у стањима редуковане гломеруларне филтрације, које се јављају као последица оштећења реналног ткива.^{413,414} Нефротоксични ефекат цисплатине евидентиран је изразито високим вредностима урее, креатинина и мокраћне киселине у серуму у односу на контролну групу ($p < 0,001$). Најупечатљивији скок је примећен за креатинин, који је у групи третираној цисплатином показао скоро десет пута вишу вредност него што је то прочитано за контролу. Третман екстрактима АВН и АВК показује да у скоро свим концентрацијама и на нивоу сва три параметра долази до значајног смањења оштећења бубрега, што се манифестује

нормализацијом нивоа тестираних параметара. Као што је представљено у Табели 14, уочавају се сличности у дејству екстраката надземног дела и корена на нивоу појединачних показатеља функције бубрега, иако као и у случају биохемијских параметара јетре, изостаје дозна зависност. Резултати су показали да најнижа концентрација и АВН и АВК узрокује изузетно смањење концентрације урее и креатинина у односу на групу третирану цисплатином (II; $p < 0,001$), чак до идентичних вредности као у нетретираној групи.

Као најмање ефикасне у редуковању концентрације урее и креатинина показале су се дозе од 100 mg/kg, тј. V и VIII група, за које је чак показано да очитане вредности за уреу не одступају значајно од оних добијених у групи третираној цисплатином ($p > 0,001$). Супротно томе, када је реч о мокраћној киселини, управо је ова доза и екстракта АВН и АВК значајно умањила последице деловања цисплатине ($p < 0,001$), док су друге две дозе (50 и 200 mg/kg) показале приближно исту активност. Слично вишим дозама екстраката, и елагинска киселина не доводи до значајног редуковања токсичности цисплатине на нивоу урее и креатинина, али када је реч о мокраћној киселини примењена доза елагинске киселине (100 mg/kg) снижава њен ниво до вредности контроле. Самостална примена екстраката АВН и АВК (X и XI група) не доводи до било каквих промена у односу на контролу ($p > 0,001$), изузев екстракта корена вирка у случају мокраћне киселине.

Поред деловања цисплатине на хепато-ренални систем, извршена је процена токсичног деловања и на мушки репродуктивни систем. Као серумски параметар очувања функције тестиса мерена је концентрација андрогеног хормона тестостерона, чија се синтеза обавља у мушким гонадама. Снижавање хормона у односу на контролу указује на нарушену функцију тестиса, што је и уочено приликом интраперитонеалне апликације цисплатине у дози до 7,5 mg/kg, редукујући ниво тестостерона скоро пет пута у односу на контролу ($p < 0,001$).

Табела 14. Утицај цисплатине и ко-третмана различитих концентрација метанолних екстраката надземног дела и корена *A. vulgaris* на биохемијске параметре јетре, бубрега и тестиса у серуму експерименталних животиња.

Биохемијски параметри										
Јетра							Бубрези		Тестиси	
Група	Укупни билирубин (μmol/L)	Укупни протеини (g/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	γGT (U/L)	Уреа (mmol/L)	Креатинин (μmol/L)	Мокраћна киселина (μmol/L)	Тестостерон (nmol/L)
I	1,39 ± 0,09	55,98 ± 2,79	9,49 ± 0,64	43,38 ± 2,89	92,03 ± 6,87	0,63 ± 0,09	6,53 ± 0,22	38,50 ± 3,84	69,40 ± 4,38	0,24 ± 0,04
II	2,04 ± 0,54 [†]	62,64 ± 6,24	42,33 ± 1,81 ^{†††}	111,16 ± 4,77 ^{†††}	314,27 ± 38,90 ^{†††}	4,02 ± 0,44 ^{†††}	49,04 ± 4,24 ^{†††}	314,53 ± 31,57 ^{†††}	119,80 ± 6,85 ^{†††}	0,05 ± 0,02 ^{†††}
III	1,71 ± 0,08	58,03 ± 4,22	19,30 ± 0,83 ^{†††††}	69,36 ± 3,44 ^{†††††}	150,77 ± 22,61 ^{***}	1,78 ± 0,33 ^{***}	45,29 ± 10,08 ^{†††}	192,67 ± 11,12 ^{†††††}	67,00 ± 1,00 ^{***}	0,04 ± 0,01 ^{†††*}
IV	1,76 ± 0,08	54,96 ± 5,10	27,15 ± 1,71 ^{†††††}	85,01 ± 3,86 ^{†††††}	136,25 ± 18,55 ^{***}	2,03 ± 0,19 ^{***}	6,02 ± 0,98 ^{***}	35,05 ± 4,65 ^{***}	96,75 ± 3,94 ^{†††*}	<0,025 ^{†††}
V	1,81 ± 0,06	64,44 ± 5,68	19,54 ± 1,12 ^{†††††}	84,77 ± 0,38 ^{†††††}	110,38 ± 8,02 ^{***}	3,07 ± 0,57 ^{†††}	41,10 ± 3,72 ^{†††}	175,80 ± 23,56 ^{†††††}	82,50 ± 9,82 ^{†††††}	0,03 ± 0,01 ^{†††*}
VI	1,44 ± 0,06*	68,41 ± 1,87	27,83 ± 1,40 ^{†††††}	64,11 ± 0,98 ^{†***}	138,93 ± 21,89 ^{***}	2,60 ± 0,32 ^{††*}	29,66 ± 6,18 ^{†††*}	109,73 ± 14,19 ^{†††††}	94,20 ± 1,74*	0,10 ± 0,01 ^{††*}
VII	1,98 ± 0,04 [†]	66,01 ± 4,00	27,32 ± 1,31 ^{†††††}	95,30 ± 9,27 ^{†††}	124,64 ± 26,47 ^{***}	2,94 ± 0,14 ^{†††}	11,64 ± 3,11 ^{***}	57,72 ± 10,77 ^{***}	86,25 ± 8,79 ^{†***}	0,22 ± 0,06 ^{***}
VIII	1,51 ± 0,17	57,12 ± 2,95	21,51 ± 2,90 ^{†††††}	84,78 ± 2,60 ^{†††††}	130,04 ± 25,30 ^{***}	3,71 ± 0,14 ^{†††*}	34,66 ± 5,71 ^{†††}	145,68 ± 17,54 ^{†††††}	70,00 ± 5,34 ^{***}	0,17 ± 0,02*
IX	1,75 ± 0,15	53,03 ± 2,83	25,97 ± 0,76 ^{†††††}	78,86 ± 3,26 ^{†††††}	147,77 ± 14,80 ^{***}	3,03 ± 0,63 ^{†††}	23,22 ± 3,29 ^{†***}	106,63 ± 8,68 ^{***}	79,80 ± 3,44 ^{†***}	0,20 ± 0,06 ^{**}
X	1,45 ± 0,07*	59,34 ± 6,81	11,94 ± 0,54 ^{***}	62,06 ± 1,93 ^{†††††}	149,00 ± 17,34 ^{***}	1,88 ± 0,50 ^{†***}	6,10 ± 0,71 ^{***}	38,50 ± 2,63 ^{***}	81,60 ± 3,85 ^{***}	0,27 ± 0,01 ^{***}
XI	1,46 ± 0,07*	55,98 ± 6,15	12,98 ± 0,55 ^{†***}	72,50 ± 3,38 ^{†††††}	163,85 ± 20,66 ^{***}	2,00 ± 0,40 ^{†***}	6,00 ± 1,11 ^{***}	32,26 ± 8,33 ^{***}	101,20 ± 4,93 ^{††}	0,21 ± 0,05*

Резултати у табели представљени су као аритметичка средина вредности у оквиру групе ± стандардна грешка мерења; [†], ^{††}, ^{†††} у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на контролу (I група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$; *, **, *** у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на позитивну контролу (цисплатина; II група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$. Ознаке група: I – контрола (нетретирана група); II – позитивна контрола (цисплатина); III – Елагинска киселина (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; IV – АВН (50 mg/kg т.м.) + цисплатина; V – АВН (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; VI – АВН (200 mg/kg т.м.) + цисплатина; VII – АВК (50 mg/kg т.м.) + цисплатина; VIII – АВК (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; IX – АВК (200 mg/kg т.м.) + цисплатина; X – АВН *per se* група (200 mg/kg т.м.); XI – АВК *per se* група (200 mg/kg т.м.). ALT – аланин аминотрансфераза; AST – аспартат аминотрансфераза, ALP – алкална фосфатаза; γGT – гама-глутамил трансфераза.

Велика разлика у концентрацији тестостерона у серуму примећена је у третману са свим концентрацијама екстракта АВН у односу на нетретирану групу ($p < 0,001$), са посебно израженим ниским нивоом тестостерона, чак и испод граница детекције апарата, приликом третмана најнижом концентрацијом АВН (50 mg/kg). Ипак, овај екстракт показује дозну зависност када је у питању увећање концентрације тестостерона, те се тако при концентрацијама од 100 и 200 mg/kg примећује да постоји значајан пораст у његовом нивоу у серуму у односу на групу третирану цисплатином ($p < 0,05$). Са друге стране, знатно ефикаснијим се показао екстракт корена вирка, и то нарочито у групи VII третираној најнижом дозом, у којој се измерена вредност тестостерона била скоро иста као и у контроли. Оба екстракта апликована *per se* не нарушавају хормонски ниво у серуму у поређењу са контролом, иако је за узорак АВН примећена нешто виша вредност у односу на нетретирану групу животиња.

У Табели 15 приказани су резултати протективног деловања различитих концентрација екстракта надземног дела чубра (СХН) на биохемијске показатеље очуваности јетре, бубрега и тестиса приликом једнократне изложености деловању цисплатине (7,5 mg/kg).

Резултати су поређени са силимарином, познатим комерцијално доступним хепатопротективом добијеним из млечног чкаља (*Silybum marianum*), за који је показано да поседује и корисне ефекте у виду смањења оксидативних оштећења репродуктивних органа и реналног система.^{415,416} Посматрано са аспекта укупних протеина у серуму, ни третман цисплатином, као ни примећене дозе екстраката нису показале промене у односу на контролну групу животиња ($p > 0,05$). Апликација цисплатине није узроковала значајне промене у погледу количине укупног билирубина у поређењу са контролом, иако су вредности биле благо повишене. Изразито увећане активности ензима ALT, AST, ALP ($p < 0,001$) и γ GT ($p < 0,01$) уочене су између контролне групе (I) и групе II којој је апликована цисплатина. У групама које су третиране екстрактом СХН у дозама 50, 100 и 200 mg/kg (III - V) примећено је значајно редуковање активности ових ензима у односу на групу II, са циљем нормализације активности до оне одређене у контроли. Изузетак представља активност гама-глутамил трансферазе, чија вредност при апликацији најниже концентрације екстракта превазилази активност запажену у групи третираној само цисплатином. Међусобним поређењем концентрација, најефикаснијом се показала доза од 100 mg/kg (IV), која доприноси статистички значајном смањењу активности AST, ALP, γ GT ($p < 0,01$) и ALT ($p < 0,001$) у односу на групу II. Референтно једињење, силимарин, такође показује изразито високу способност редуковања активности ових ензима у поређењу са групом третираном цисплатином.

Табела 15. Утицај цисплатине и ко-третмана различитих концентрација метанолних екстраката надземног дела *S. hortensis* на биохемијске параметре јетре, бубрега и тестиса у серуму експерименталних животиња.

Биохемијски параметри										
Јетра						Бубрези			Тестиси	
Група	Укупни билирубин (μmol/L)	Укупни протеини (g/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	γGT (U/L)	Уреа (mmol/L)	Креатинин (μmol/L)	Мокраћна киселина (μmol/L)	Тестостерон (nmol/L)
I	1,55 ± 0,05	58,21 ± 3,03	18,96 ± 2,97	42,86 ± 3,90	92,80 ± 19,35	118,73 ± 16,05	6,37 ± 0,41	39,84 ± 2,78	76,35 ± 3,01	0,42 ± 0,10
II	1,91 ± 0,01	57,88 ± 2,76	34,45 ± 7,39 ^{††}	113,31 ± 6,24 ^{†††}	229,40 ± 32,74 ^{†††}	384,28 ± 28,14 ^{††}	78,88 ± 8,98 ^{†††}	499,63 ± 64,35 ^{†††}	81,35 ± 3,48	0,07 ± 0,03 ^{††}
III	1,74 ± 0,08	53,35 ± 1,38	22,77 ± 3,41 [*]	64,04 ± 8,41 ^{**}	144,55 ± 10,55 [*]	426,70 ± 17,62 ^{††}	88,53 ± 10,47 ^{†††}	472,73 ± 62,47 ^{†††}	69,23 ± 8,53	< 0,025 ^{†††}
IV	1,22 ± 0,08 [*]	60,10 ± 1,92	22,95 ± 2,38 ^{***}	56,67 ± 5,54 ^{**}	132,84 ± 21,59 ^{**}	72,13 ± 16,25 ^{**}	31,31 ± 8,87 ^{††††}	135,48 ± 49,91 ^{††††}	74,20 ± 6,29	0,38 ± 0,23 [*]
V	1,55 ± 1,20	61,17 ± 3,33	25,02 ± 1,83 [*]	64,70 ± 5,51 ^{**}	167,33 ± 14,40 ^{†*}	208,37 ± 24,76 [*]	99,59 ± 4,41 ^{†††*}	489,93 ± 31,05 ^{†††}	55,00 ±	< 0,025 ^{†††}
VI	1,16 ± 0,07 [*]	54,82 ± 0,96	14,15 ± 0,90 ^{***}	46,42 ± 9,45 ^{***}	131,91 ± 13,34 ^{***}	105,80 ± 14,61 ^{**}	28,74 ± 4,71 ^{†††††}	159,10 ± 15,72 ^{††††}	59,75 ±	0,47 ± 0,11 ^{**}
VII	1,63 ± 0,05	62,09 ± 1,64	26,36 ± 0,30 [*]	51,88 ± 6,04 ^{***}	161,21 ± 12,71 ^{†*}	182,00 ± 34,78 ^{†*}	6,86 ± 0,37 ^{***}	44,28 ± 2,72 ^{***}	77,80 ± 6,70	2,72 ± 0,92 ^{†††††}

Резултати у табели представљени су као аритметичка средина вредности у оквиру групе ± стандардна грешка мерења; [†], ^{††}, ^{†††} у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на контролу (I група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$; ^{*}, ^{**}, ^{***} у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на позитивну контролу (цисплатина; II група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$. Ознаке група: I – контрола (нетретирана група); II – позитивна контрола (цисплатина, 7,5 mg/kg т.м.); III – CXH (50 mg/kg т.м.) + цисплатина; IV – CXH (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; V – CXH (200 mg/kg т.м.) + цисплатина; VI – Силимарин (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; VII – CXH *per se* група (200 mg/kg т.м.). ALT – аланин аминотрансфераза; AST – аспартат аминотрансфераза, ALP – алкална фосфатаза; γGT – гама-глутамил трансфераза.

Самостална примена екстракта СХН у највишој тестираној концентрацији (VII; 200 mg/kg) не доводи до промена на нивоу биохемијских параметара јетре у серуму. Међутим, у овој групи је примећено да је активност ензима ALP и γ GT нешто виша у односу на контролу ($p < 0,05$). Када је реч о деловању екстракта на обнављање нарушене бубрежне функције услед токсичног деловања цисплатине, може се констатовати да је и у овом случају доза екстракта од 100 mg/kg показала знатно бољу активност у односу на вишу и нижу примећену дозу. Посебно треба нагласити да је уреа у групи третираној екстрактом СХН у дози 50 mg/kg детектована у концентрацијама вишим него што су одређене у групи третираној цисплатином. Слично, приближне вредности у нивоу креатинина очитане су између позитивне контроле (II) и екстракта у дозама 50 и 200 mg/kg. Третман екстрактом у дози од 100 mg/kg (IV) и силимарином (VI) у истој концентрацији доприноси значајном смањењу количине укупног билирубина у односу на групу третирану цисплатином (II). У оквиру наших истраживања, силимарин је показао значајно смањење токсичности цисплатине на нивоу сва три показатеља функционалности реналног ткива. Статистички значајне разлике у концентрацији урее и креатинина уочене су и између групе третиране цисплатином и СХН *per se* групе ($p < 0,001$), са вредностима готово истоветним онима у контроли ($p > 0,05$).

Драстично смањење концентрације тестостерона у поређењу са контролом примећено је након апликације цисплатине ($p < 0,001$). Готово идентично као у случају најниже дозе екстракта АВН, и екстракт СХН у концентрацијама од 50 и 200 mg/kg доводи до смањене концентрације тестостерона у серуму, које је доста ниже и од нивоа измереног у групи третираној цисплатином. Приближне вредности у односу на контролну групу ($p > 0,05$) уочене су десетодневном применом силимарина и СХН у дози од 100 mg/kg. Неочекивано висок скок у концентрацији тестостерона у серуму у односу на контролу ($p < 0,001$) евидентиран је у групи којој је апликован екстракт СХН *per se*. Ниво тестостерона је приближно шест пута већи код животиња у овој групи у поређењу са нетретираном групом.

Велики број студија бавио се споредним негативним ефектима примене цисплатине у клиничке сврхе. Нефротоксичност, хепатотоксичност, дегенеративне промене на нивоу репродуктивних органа, кардиоваскуларног система и гастроинтестиналног тракта представљају само неке од нус појава уочених након изложености цисплатини приликом хемиотерапије. Резултати добијени у оквиру ове дисертације надовезују се на претходно описане алтерације које су потврђене нарушеним биохемијским параметрима јетре, бубрега и тестиса као последицом

једнократне апликације цисплатине (7,5 mg/kg). Значајна повећања у активностима ензима - параметара оштећења јетре уочена су и у другим студијама.⁴¹⁷ Увезано је мишљење да су повећане вредности хепатичних ензима у серуму резултат дисрупције и повећања пермеабилности плазма мембране хепатоцита и апоптотичких и некротичких процеса у овим ћелијама, као што су кондензовање хроматина и формирање апоптотских тела, што има за последицу ослобађање интрацелуларних ензима, попут аминотрансфераза, у периферну циркулацију.^{418,419}

Свега неколико студија бавило се хепатопротективним потенцијалом биљака родова *Alchemilla* и *Satureja*.^{420,421} Важно је напоменути да су подаци који указују на бенефите примене екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis* приликом оштећења ткива цисплатином први пут представљене у оквиру ове дисертације. Доступни литературни подаци указују да поједине биљке ова два рода садрже једињења која показују потенцијал да буду даље истраживана у циљу формулације нових хепатопротектива на биљној бази. Значајно редуковање токсичности на нивоу јетре изазване угљен-тетрахлоридом примећено је применом екстракта надземног дела и корена *A. mollis*. Слично запажањима у нашој студији, и у поменутом истраживању је примећено да третман екстрактом води снижавању активности ALT и AST у серуму, при чему се ефикаснијом показала доза од 100 mg/kg у односу на 200 mg/kg. Овакав резултат је вероватно последица антиоксидативног деловања екстракта и очувања селективне пермеабилности мембране.⁴²² У другом сличном експерименталном дизајну, где је оштећење јетре изазвано CCl₄, показано је да екстракт *Satureja macrostema* значајно доприноси редуковању нивоа ALT, AST и ALP при дози од 800 mg/kg, у којој своди ензиме на вредности упоредиве са ефектом силимарина (100 mg/kg).⁴²¹ Иако се може претпоставити да су за овакво деловање оба екстракта највише заслужне доминантне компоненте, елагинска киселина, катехин и рузмаринска киселина, које, примећене самостално, показују низ благотворних ефеката на нивоу јетре^{166,423,424}, треба узети у обзир да у одсуству података о специфичним фракцијама одређених група компонената није могуће са сигурношћу приписати хепатопротективна својства појединачним једињењима. Ипак, према појединим ауторима, смањење токсичних ефеката на нивоу јетре приликом примене екстракта у директној је корелацији са садржајем укупних фенолних једињења и флавоноида.^{425,426}

Цисплатина узрокује низ промена на нивоу бубрега, а једна од примарних нус појава је изражено смањење гломеруларне филтрације и смањење протока крви, што директно утиче на повећање нивоа креатинина, мокраћне киселине и урее у серуму,

узимајући у обзир да се екскреција ових метаболита из организма врши путем бубрежне филтрације.⁴²⁷ Према доступним литературним подацима, утицај екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis* на бубрежну функцију приликом излагања неком индуктору оксидативног стреса, или при самосталној примени у одсуству ткивног оштећења, по први пут су испитани у овој дисертацији. Како тестиране концентрације испољавају протективно деловање у стањима редуковане реналне функције и будући да не показују никакве негативне ефекте на биохемијске параметре бубрега уколико се примењују *per se*, они могу бити добри кандидати за продубљивање истраживања којима би се омогућио детаљнији увид у механизме нефропротективног деловања, што би у перспективи могло бити база за формулисање нових препарата за превенцију и лечење обољења реналног система, попут акутне бубрежне инсуфицијенције. Како постоје наводи да су доминантна једињења у екстрактима биљака *A. vulgaris* и *S. hortensis* добри протектори реналног ткива у стањима оксидативних оштећења изазваних цисплатином^{428,429}, будућа истраживања би могла бити усмерена и на друге природне изворе ових фенола.

Иако оштећења репродуктивног система приликом изложености деловању цисплатине нису добро испитана, истраживања указују да се токсични ефекти примарно испољавају на нивоу хормонског статуса, пре свега путем нарушавања стероидогенезе и биосинтезе тестостерона, чиме се његова концентрација у серуму рапидно смањује.⁴³⁰ У оквиру наших истраживања запажено је да ко-третман екстрактима *A. vulgaris* и *S. hortensis* при излагању пацова деловању цисплатине показује позитивне ефекте на ниво тестостерона, повећавајући његову концентрацију у крви. Важно је напоменути да је екстракт чубра, апликован самостално, довео до знатног повећања концентрације тестостерона, што је такође примећено у другим студијама на водено-алкохолном екстракту ртањског чаја (*S. montana*)⁴³¹ и етарском уљу *S. khuzestanica*⁴³², чиме се практично верификује етнофармаколошка примена врста рода *Satureja* у сврхе стимулаторног деловања на мушки репродуктивни систем. У недавно спроведеној клиничкој студији показано је да комерцијално доступна мешавина која садржи и екстракт *S. montana* благотворно делује на превазилажење проблема преурањене ејакулације код мушкараца.⁴³³ У прилог томе говори и одобрени међународни патент о употреби екстракта ртањског чаја богатог рузмарином киселином у третману превремене ејакулације.⁴³⁴

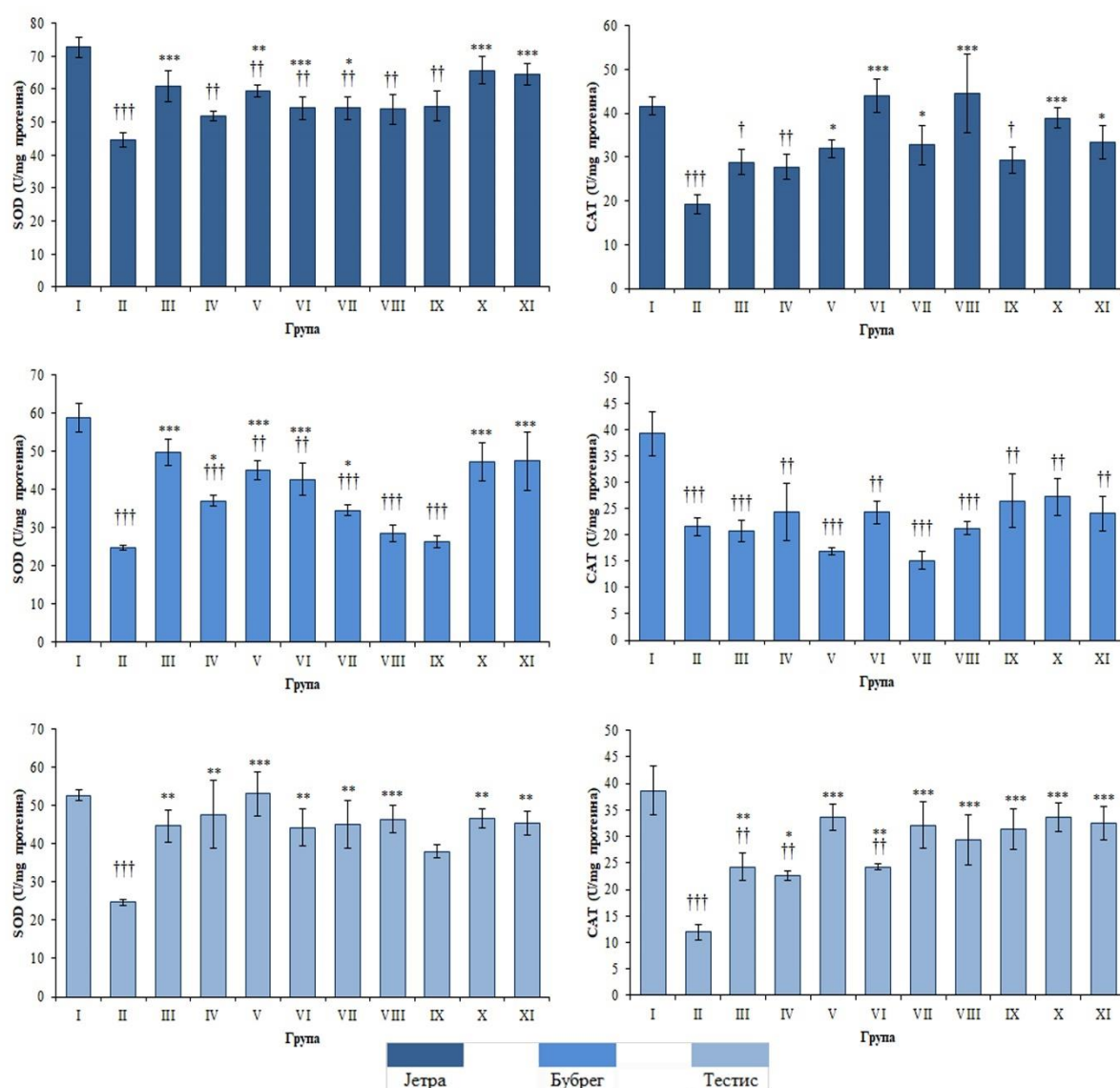
5.7.2. Одређивање параметара оксидативног стреса у ткивима

Биомаркери оксидативног стреса у ткивима представљају, у најширем смислу, молекуле који интерагују са слободнорадикалским врстама и чији се ендогени ниво мења као одговор на стање оксидативног стреса *in vivo*, те је посматрање ових параметара од прогностичког значаја за процену редокс стања органа.⁴³⁵ У превенцију и одбрану ћелија од прекомерне количине слободних радикала укључени су ензимски (нпр. каталаза, глутатион пероксидаза, супероксид дисмутаза) и неензимски ендогени системи попут глутатиона и витамина.²¹⁸ У оквиру ове дисертације, као биомаркери промена у редокс равнотежи јетре, бубрега и тестиса, приликом изложености цисплатини, посматране су активности ензима каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD) и нивои редукованог глутатиона (GSH) и крајњих продуката оксидације липида (TBARS).

На *Слици 30* је приказан ефекат елагинске киселине и дефинисаних доза екстракта надземног дела и корена *A. vulgaris* на активност ензима CAT и SOD, док је на *Слици 31* приказан њихов ефекат на нивое GSH и TBARS у испитиваним ткивима. Представљени резултати недвосмислено указују на то да третман цисплатином у концентрацији 7,5 mg/kg узрокује значајне алтерације у свим тестираним биомаркерима оксидативног стреса у јетри, бубрезима и тестисима ($p < 0,001$).

У погледу ензимске активности каталазе, цисплатина је значајно редуковала активност овог ензима ($p < 0,001$) у испитиваним ткивима. Третман екстрактом АВН у различитим концентрацијама делује као промотор активности каталазе на нивоу јетре и тестиса (*Слика 30*). Доза АВН од 200 mg/kg значајно повећава активност каталазе у јетри у односу на групу третирану цисплатином ($p < 0,001$), док се на нивоу тестиса најефикаснијом показала средња доза АВН (100 mg/kg). Са друге стране, иако је активност бубрежне каталазе приликом апликације АВН (50 и 100 mg/kg) била благо увећана у односу на позитивну контролу (II група), на основу статистичке анализе констатовано је одсуство позитивног ефекта свих тестираних доза АВН на активност каталазе у бубрезима. Исти закључак изведен је и на нивоу екстракта АВК. Супротно томе, све тестиране концентрације АВК показују значајно протективно деловање на активност каталазе у тестисима у односу на групу третирану цисплатином ($p < 0,001$), показујућу при томе активност ензима готово одговарајућу оној у нетретираној групи (група I). Апсолутно исти ефекат, само на нивоу јетре, показала је доза од 100 mg/kg АВК. Поређењем резултата добијених за екстракте и оних очитаних за елагинску

киселину, уочава се да су оба испитивана екстракта, а нарочито АВК, приметно ефикаснији у репарацији активности каталазе на нивоу јетре, бубрега и тестиса.



Слика 30. Утицај цисплатине, елагинске киселине и екстракта надземног дела и корена *A. vulgaris* на активност супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова.

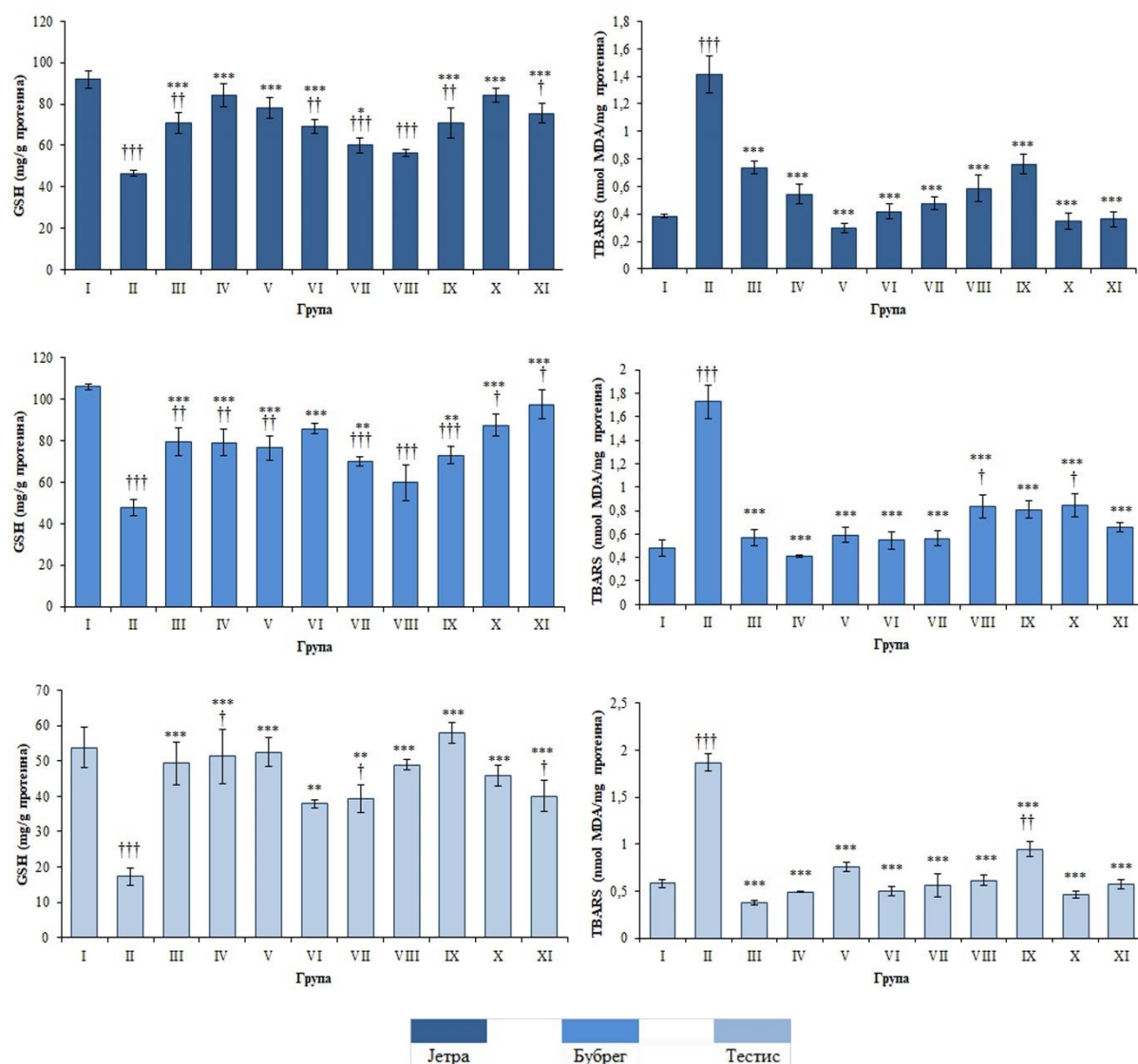
Легенда: †, ††, ††† у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на контролу (I група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$; *, **, *** у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на позитивну контролу (цисплатина; II група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$. Ознаке група: I - контрола (нетретирана група); II - цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III - цисплатина+елагинска киселина (100 mg/kg), IV - цисплатина + АВН (50 mg/kg), V - цисплатина + АВН (100 mg/kg), VI - цисплатина + АВН (200 mg/kg), VII - цисплатина+АВК (50 mg/kg), VIII - цисплатина + АВК (100 mg/kg), IX - цисплатина + АВК (200 mg/kg), X - АВН *per se* (200 mg/kg) и XI - АВК *per se* (200 mg/kg).

Када је реч о самосталној апликацији екстраката АВН и АВК у највишим тестираним дозама, важно је истаћи да је запажена нижа активност каталазе у бубрезима у односу на нетретирану групу ($p < 0,01$). За разлику од бубрега, ова два екстракта не узрокују промене у каталитичкој активности каталазе у јетри и тестисима пацова.

Слика 30 приказује ефекте АВН и АВК на каталитичку активност супероксид дисмутазе да диспропорционише супероксидни анјон радикал на водоник-пероксид и молекулски кисеоник. Изражено смањење каталитичке способности SOD примећено је у групи третираној цисплатином (група II). Метанолни екстракт АВН у свим примењеним дозама (групе IV-VI) доприноси значајном побољшању активности супероксид дисмутазе у јетри, бубрезима и тестисима. Доза АВН од 100 mg/kg (група V) показала се ефикаснијом од друге две тестиране дозе екстракта. Када је реч о екстракту АВК, нормализовање активности SOD најизраженије је било у тестисима, при чему се по ефикасности опет издваја средња доза екстракта (група VIII). Међутим, екстракт АВК у концентрацијама од 100 и 200 mg/kg није показао значајне разлике у активности SOD у јетри и бубрезима у поређењу групом третираном цисплатином ($p > 0,05$). Једина значајна промена ($p < 0,05$) у хомогенту јетре и бубрега у односу на позитивну контролу (II) уочена је применом најниже дозе екстракта АВК (група VII). Значајно побољшање функције супероксид дисмутазе у односу на групу II примећује се у сва три испитивана ткива приликом третмана животиња елагинском киселином (III) ($p < 0,001$). Орална примена екстраката АВН и АВК у десетодневном третману у највишој тестираној дози (200 mg/kg; групе X и XI) показују вредности сличне контролној нетретираној групи ($p > 0,05$).

Значајна одступања у нивоу редуковане форме глутатиона (GSH), значајног не-ензимског ендеогеног антиоксиданта, примећена су у групи третираној цисплатином ($p < 0,001$) у односу на нетретирану контролну групу (I) (Слика 31). Резултати показују да третман елагинском киселином и екстрактом надземног дела *A. vulgaris* у свим примењеним концентрацијама пет дана пре и пет дана након интраперитонеалне апликације цисплатине, значајно повећава ниво GSH у јетри, бубрезима и тестисима ($p < 0,001$). Исти ефекти запажени су и на нивоу тестиса приликом третмана свим дефинисаним дозама екстракта корена. У бубрезима, GSH је, у односу на групу третирану цисплатином, био значајно повећан аплицирањем екстракта у најнижој и највишој концентрацији (VII и IX) ($p < 0,01$), док средња концентрација АВК благо повећава ниво GSH у односу на позитивну контролу (група II), али је тај ефекат занемарљив, узимајући у обзир да је уочена статистички значајна разлика између ове и нетретиране групе ($p < 0,001$). Исти модел деловања запажа се и у јетри. Екстракти у дози

200 mg/kg, примењени у одсуству третмана цисплатином (групе X и XI), показују вредности готово истоветне нетретираној групи ($p>0,05$), сугеришући тиме да *per se* апликација екстракта не доводи до промена у нивоу редукованог глутатиона.



Слика 31. Утицај цисплатине, елагинске киселине и екстракта надземног дела и корена *A. vulgaris* на ниво глутатиона (GSH) и тиобарбитурна киселина-реагујућих једињења (TBARS) у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова.

Легенда: †, ††, ††† у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на контролу (I група) при $p<0,05$, $0,01$, $0,001$; *, **, *** у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на позитивну контролу (цисплатина; II група) при $p<0,05$, $0,01$, $0,001$. Ознаке група: I - контрола (нетретирана група); II - цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III - цисплатина + елагинска киселина (100 mg/kg), IV - цисплатина + АВН (50 mg/kg), V - цисплатина+АВН (100 mg/kg), VI - цисплатина + АВН (200 mg/kg), VII - цисплатина+АВК (50 mg/kg), VIII - цисплатина + АВК (100 mg/kg), IX - цисплатина + АВК (200 mg/kg), X - АВН *per se* (200 mg/kg) и XI-АВК *per se* (200 mg/kg).

Развој стања оксидативног стреса у јетри, бубрезима и тестисима применом цисплатине у дози 7,5 mg/kg потврђен је и изузетно високом количином тиобарбитурна киселина-реагујућих једињења у групи II ($p < 0,001$) у односу на нетретиране животиње (Слика 31). Третман елагинском киселином, као и свим дозама АВН и АВК анулира оксидацију липида у посматраним органима ($p < 0,001$), а степен оксидације липида у групама које су примале само екстракте, без третмана цисплатином, у равни је са контролом ($p > 0,05$). Доза од 100 mg/kg АВН показала се као најефикаснија у хомогенату бубрега и тестиса (V), док је истом ефекту у јетри допринела најнижа концентрација (група IV). Екстракт АВК примењиван десет дана показује дозно зависно смањење оштећења ткива јетре и тестиса изазваног цисплатином у петом дану експеримента.

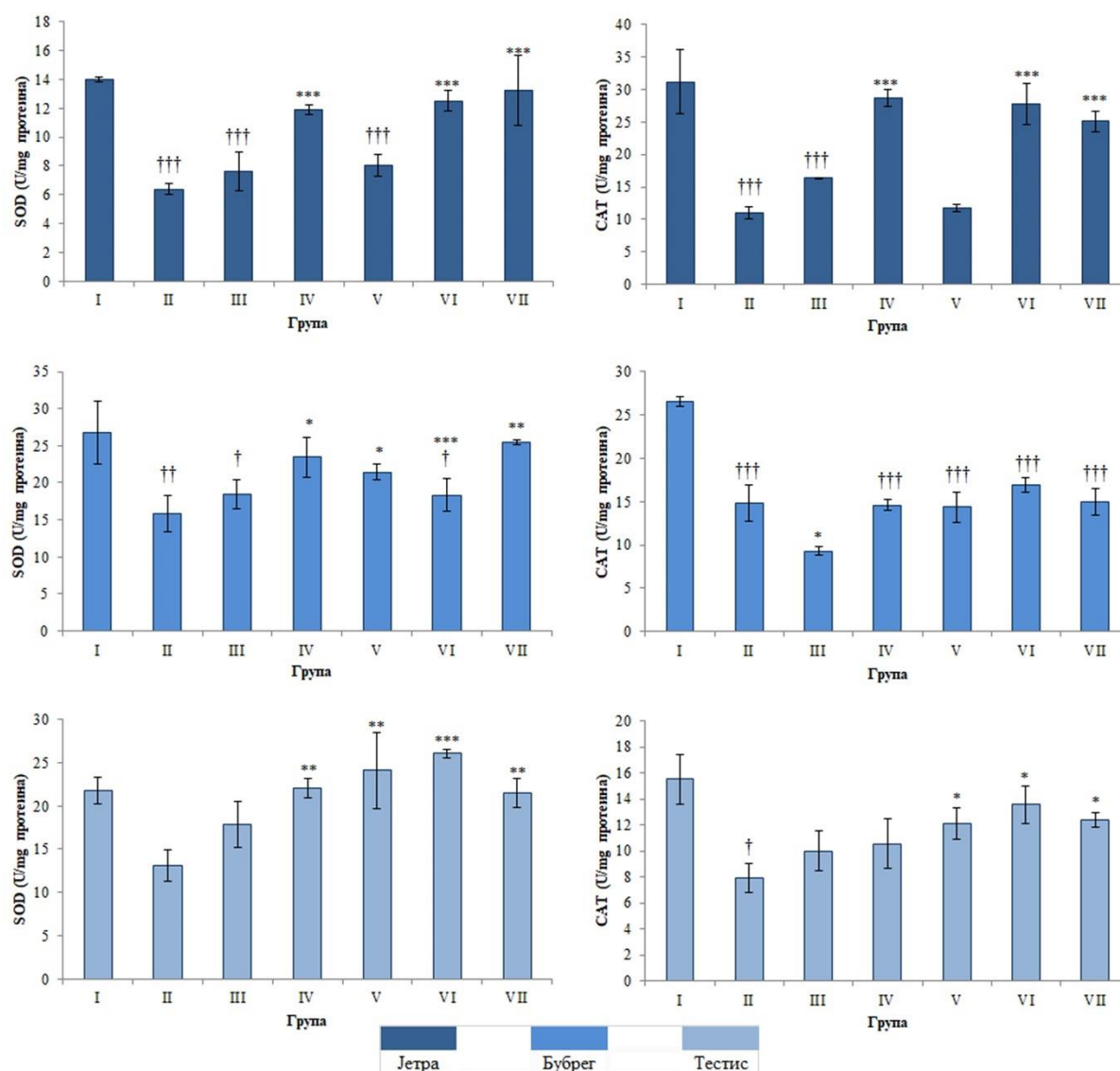
Резултати испитивања утицаја метанолног екстракта надземног дела *S. hortensis* на смањење оксидативног стреса у ткивима изазваног цисплатином приказани су на Сликама 32 и 33.

Анализирањем добијених података могуће је закључити да једино СХН у дози од 100 mg/kg значајно доприноси нормализацији активности каталазе у јетри ($p < 0,001$) у односу на групу третирану цисплатином, док је на нивоу тестиса тај ефекат примећен једино за концентрацију 200 mg/kg (V) ($p < 0,05$) (Слика 32). Изузев дозе од 50 mg/kg екстракта, остале нису показале статистички значајна побољшања у погледу каталитичке активности САТ у бубрезима. Резултати добијени за екстракт СХН поређени су са силимарином. Силимарин је показао изразито повећање активности каталазе у јетри ($p < 0,001$) и тестисима ($p < 0,05$), док на нивоу бубрега није показао значајније деловање. Десетодневни третман СХН екстрактом у највишој концентрацији (200 mg/kg, VII) показује да не долази до нарушавања ензимске активности каталазе у јетри и тестисима, што се види на основу вредности које су приближне нетретираној групи. Изузетак представљају бубрези, код којих је евидентирана изражена редукована активност каталазе у односу на контролу ($p < 0,001$).

Значајно повећање активности SOD у јетри у односу на позитивну контролу (II) остварено је применом екстракта СХН у концентрацији од 100 mg/kg, као и силимарина у истој концентрацији ($p < 0,001$). Иако је третман са друге две дозе екстракта показао благо повишену активност у односу на групу која је подвргнута третману цисплатином, обе групе (III и V) се значајно разликују од контролне, нетретиране групе животиња (I) ($p < 0,001$) (Слика 32).

Када је реч о хомогенату бубрега, од свих тестираних узорака једино дозе од 100 и 200 mg/kg доводе до повећања активности SOD ($p < 0,05$) у односу на II групу, што је

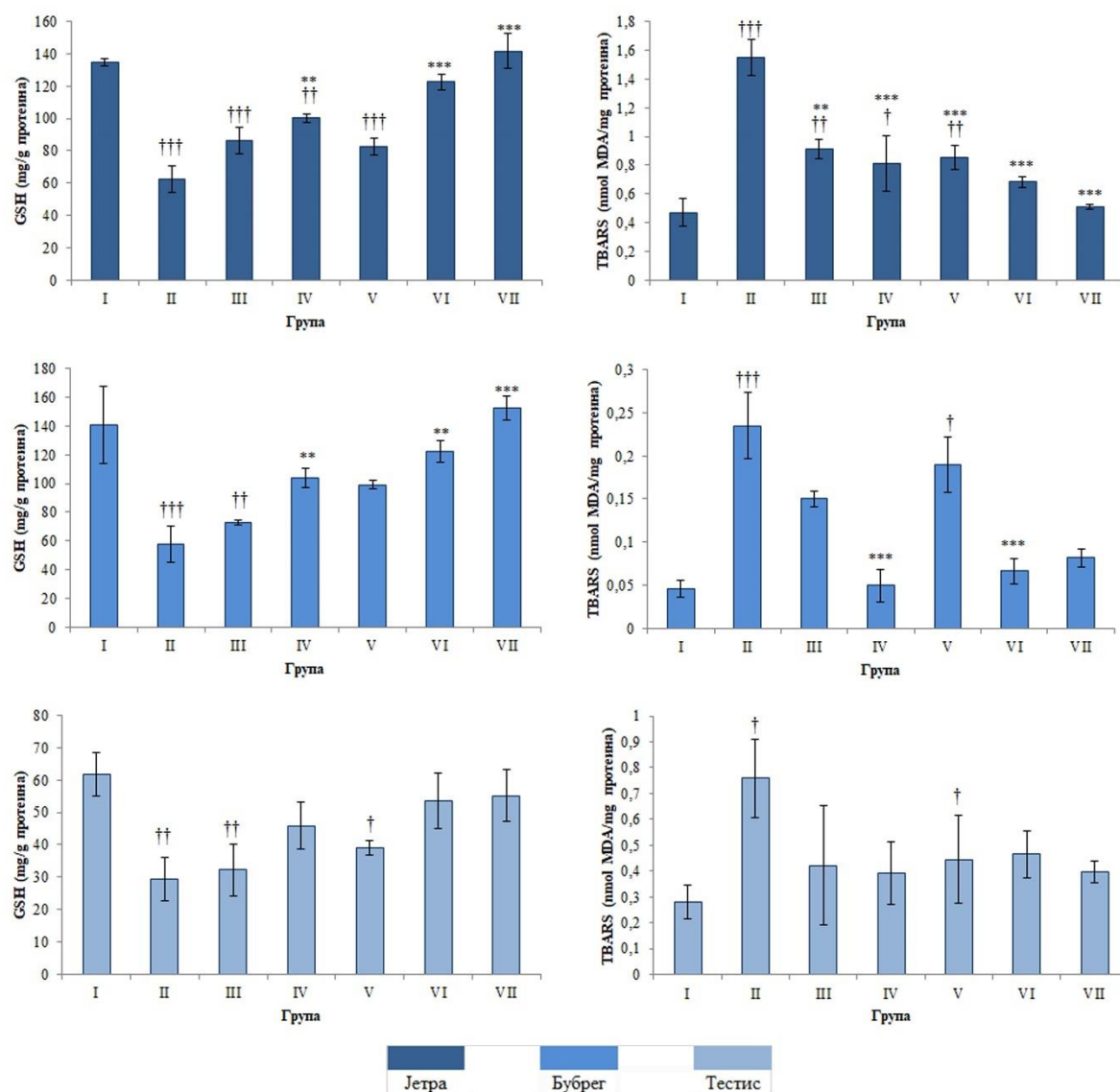
примећено и у хомогенату тестиса ($p < 0,001$). Ензимска активност SOD одређена у групи која је добијала CXH *per se* одговара контролној групи (I).



Слика 32. Утицај цисплатине, силимарина и екстракта надземног дела *S. hortensis* на активност супероксид дисмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова.

Легенда: †, ††, ††† у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на контролу (I група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$; *, **, *** у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на позитивну контролу (цисплатина; II група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$. Ознаке група: I – контрола (нетретирана група); II – позитивна контрола (цисплатина, 7,5 mg/kg т.м.); III – CXH (50 mg/kg т.м.) + цисплатина; IV – CXH (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; V – CXH (200 mg/kg т.м.) + цисплатина; VI – Силимарин (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; VII – CXH *per se* група (200 mg/kg т.м.).

Апликација цисплатине 5. дана експеримента и примена екстракта СХН пет дана пре и после третирања цисплатином узрокује значајно повећање просечних вредности редукваног глутатиона у хомогенату јетре и бубрега при средњој тестираној дози (100 mg/kg) ($p < 0,01$). Преостале дозе показују тенденцију ка нормализацији количине GSH, мада тај ефекат није од статистичког значаја (Слика 33).



Слика 33. Утицај цисплатине, силимарина и екстракта надземног дела *S. hortensis* на ниво глутатиона (GSH) и тиобарбитурна киселина-реагујућих једињења (TBARS) у ткиву јетре, бубрега и тестиса пацова.

Легенда: †, ††, ††† у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на контролу (I група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$; *, **, *** у експоненту означава да је вредност статистички значајно различита у односу на позитивну контролу (цисплатина; II група) при $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$. Ознаке група: I – контрола (нетретирана група); II – позитивна контрола (цисплатина, 7,5 mg/kg т.м.); III – СХН (50 mg/kg т.м.) + цисплатина; IV – СХН (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; V – СХН (200 mg/kg т.м.) + цисплатина; VI – Силимарин (100 mg/kg т.м.) + цисплатина; VII – СХН *per se* група (200 mg/kg т.м.).

Са друге стране, уочено је да силимарин у концентрацији од 100 mg/kg доприноси смањењу оксидативног деловања цисплатине на редуковани глутатион у сва три органа. Такође, екстракт СХН примењиван без узроковања оксидативних оштећења хемиотерапеутиком показује одржавање нивоа редукованог глутатиона у рангу контроле ($p>0,05$). Најзапаженији утицај екстракта на смањење оксидативног деловања цисплатине забележен је на нивоу оксидације липида. Резултати (Слика 33) показују да све примењене дозе екстракта узрокују смањење тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци у односу на позитивну контролу. Изузетак представља једино хомогенат тестиса, у којем није уочено да постоји статистички значајна разлика између третмана силимарином и екстрактима у свим тестираним концентрацијама у односу на II групу ($p>0,05$). Као и за претходне биомаркере, и у случају овог параметра изостаје дозна зависност, те се тако доза од 100 mg/kg показала најактивнијом. Значајније промене између контроле (I) и екстракта у дози од 200 mg/kg (VI) нису примењене.

Подаци добијени у овој дисертацији су прве научне информације који показују да примена екстракта *A. vulgaris* и *S. hortensis* може имати утицаја на смањење оксидативних оштећења органа изазваних цисплатином. Упоредном анализом добијених резултата, може се закључити да је доза од 100 mg/kg екстракта АВН и СХН најефикаснија у смањењу последица оксидативног оштећења, при чему су наведени ефекти израженији на нивоу екстракта *S. hortensis*. Са друге стране, екстракт АВК је показао да је за поједине параметре изједначен ефекат дозе од 50 и 100 mg/kg. У целокупном ефекту на јетру, ренални систем и тестисе, укључујући биомаркере у хомогенату и биохемијске индикаторе оштећења у серуму, екстракт АВН је показао супериорнију активност у односу на екстракте АВК и СХН. Ипак, када је реч о дозама, треба узети у обзир да су примењена понека одступања у групама код којих су примењивани екстракти *per se* у односу на нетретиране животиње. Базирајући се на резултатима ових истраживања, могло би се констатовати да се плато одговора у *in vivo* условима постиже применом екстракта у дозама од 100 mg/kg, те да више дозе вероватно доприносе про-оксидативном ефекту.

Као најслабија карика у клиничкој употреби цисплатине испоставила се њена токсичност на здравим ткивима.⁴³⁶ Промене у редокс стању органа изложених деловању овог комплекса платине су све више предмет савремених истраживања, која у великој мери настоје да пронађу механизме којима би се редуковали токсични ефекти цисплатине и проширио обим њене примене.

Претходна истраживања показала су да се споредни ефекти примене цисплатине прво уочавају на бубрезима, а потом на репродуктивним органима и јетри.⁴³⁷ У оквиру наших истраживања, показано је да цисплатина испољава токсично деловање на нивоу јетре, бубрега и тестиса изазивањем стања повећаног оксидативног стреса тако да су били запажени смањени капацитети антиоксидативне заштите у ткивима поменутих органа, смањене активности каталазе и супероксид дисмутазе, снижен ниво редукованог глутатиона и повећан степен липидне пероксидације, што је сагласно резултатима других аутора.^{438,439} Вишеструке студије показале су да је у основи токсичног деловања цисплатине генерисање оксидативног стреса, иако тачни механизми за сада нису познати. На основу *in vivo* тестова, указано је да се пут генерисања реактивних врста кисеоника деловањем цисплатине може остварити путем цитохром Р450 система.⁴⁴⁰ Настали слободни радикали директно реагују са ДНК, микрофиламентима цитоскелета, липидима и протеинима, затим са ензимским системима, укључујући и смањење активности ендогених антиоксиданата.^{441–443} Иако је у патогенезу оштећења узрокованих цисплатином укључен велики број реактивних врста кисеоника, али и азота⁴⁰⁹, сматра се да би могућа мета деловања агенаса за супресију токсичности цисплатине могао бити водоник-пероксид и деловање на каталитичку активност каталазе.⁴⁴⁴ Са друге стране, одређени резултати су показали да је за спречавање токсичности на нивоу епителних ћелија бубрега најзаслужнија активност супероксид дисмутазе, а не каталазе.⁴⁴⁵ Поред наведеног, доказано је да је нефротоксичност цисплатине узрокована њеном метаболичком активацијом у бубрезима. Прецизније, у циркулацији, цисплатина реагује са тиолним групама глутатиона градећи конјугате, који подлежу биотрансформацији деловањем глутатион-S-трансферазе. Када настали конјугати доспеју до бубрега, они се преводе у реактивни нефротоксични метаболит деловањем γ -глутамил транспептидазе (кључног ензима за нефротоксичност цисплатине), који потом реагује са макромолекулама узрокујући оштећења.⁴⁴⁶ Стога пад у количини глутатиона услед изложености деловању цисплатине интензивира каскадну реакцију липидне пероксидације, дисфункцију митохондрија и напослетку нарушавање интегритета ћелијске мембране и ћелијске смрти.⁴⁴⁷ Липидна пероксидација узрокована слободним радикалима је нарочито изражена на нивоу тестиса, будући да је у њиховој мембрани заступљена велика количина полинезасићених масних киселина.⁴⁴⁸

5.7.3. Хистопатолошка анализа

Потенцијално протективно деловање екстракта надземног дела *A.vulgaris* и *S. hortensis*, као и корена *A.vulgaris* на оксидативни стрес изазван применом цисплатине је, осим биохемијским анализама, посматрано и са морфолошког аспекта. На *Сликама 34 - 39* приказани су резултати хистопатолошке анализе ткивних исечака јетре, бубрега и тестиса снимљених при увећању микроскопа од 100 пута, а приказ интензитета детектованих промена у ткивима представљен је у *Табелама 16 и 17*. Промене у табелама класификоване су према изражености, те тако – означава одсуство промене, + слабу, ++ умерену и +++ изражену промену.

Преглед збирних промена морфологије јетре унутар дефинисаних група животиња при третману цисплатином и ко-третману екстрактима АВН и АВК, као и елагинском киселином, дат је у *Табели 16*. Ткиво јетре у контролној групи показује нормалну архитектуру хепатоцита, са нормалном хистологијом синусоида и централне вене, без трагова дегенеративних промена (*Слика 34(I)*).

Хистопатолошка анализа је показала да се након петог дана од третмана цисплатине уочавају умерене промене у морфологији јетре, које су израженије у односу на контролну групу. У овој групи идентификоване су хидропсна дегенерација хепатоцита, фокална литичка некроза, конфлуентна некроза, хиперплазија Купферових ћелија и лимфоцитни инфилтрати у портним просторима. Конфлуентна некроза је запажена једино у овој групи животиња (*Слика 34(II)*). Изузев у групи која је третирана елагинском киселином (III) и екстрактом АВН у дози од 100 mg/kg (V), репарација ткива јетре примећена је у свим групама третираним екстрактом, где су промене класификоване као умерене.

Као што је већ више пута наглашено, најизраженији вид токсичности цисплатине је нефротоксичност. Апликација цисплатине узроковала је низ умерених промена у бубрежном ткиву: хидропсну дегенерацију епитела каналића, атрофију и десквamacију покровног епитела каналића, цистичну дилатацију тубула, појаву интралуминалних хијалиних депозита, едема интерстицијума, интерстицијског инфилтрата у којем доминирају лимфоцити, као и проширење субкапсуларног Боумановог простора (*Табела 16; Слика 35*). Контролна група показује одсуство наведених промена, с напоменом да су код две животиње идентификован интерстицијални едем и хидропсна дегенерација, али су они били слабог интензитета. Екстракти АВН и АВК значајно доприносе смањењу оштећења бубрега, што се огледа у одсуству промена у Боумановом простору и епителу каналића, као

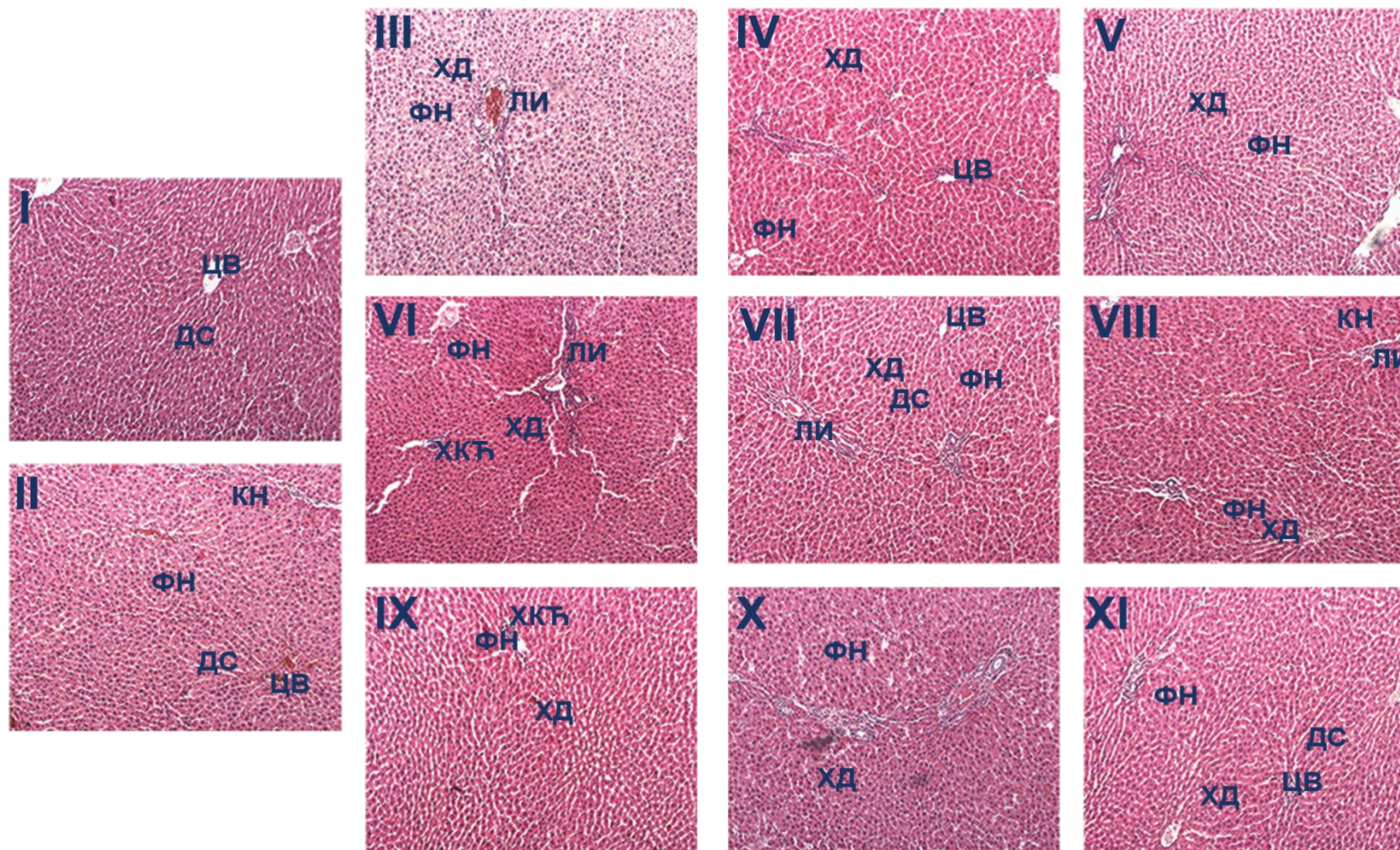
и редуковању броја интралуминалних хијалиних депозита.

Већина животиња у оквиру група које су примењивале екстракте *per se* показује знаке слабих морфолошких промена. Када је реч о тестисима, контролна група животиња показује нормалну архитектуру герминативног епитела и Сертолијевих ћелија у семиниферним цевчицама (Табела 16). Третман цисплатином нарушава ту структуру, узрокујући дегенерацију и атрофију семиниферних каналића, дегенерацију и интралуминалну десквamacију Сертолијевих ћелија, као и деплецију Лејдигових ћелија. Изузев екстракта АВН у концентрацији од 200 mg/kg (VI), остали екстракти нису спречили промене на семиниферним каналићима. Са друге стране, елагинска киселина и најнижа доза екстракта АВН (IV) нису редуковале промене узроковане цисплатином на Сертолијевим ћелијама, док су у другим групама идентификоване благе промене (Слика 36).

Табела 16. Збирне хистолошке промене у ткивним исечцима јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња приликом излагања цисплатини и третману екстрактима надземног дела и корена *A. vulgaris*.

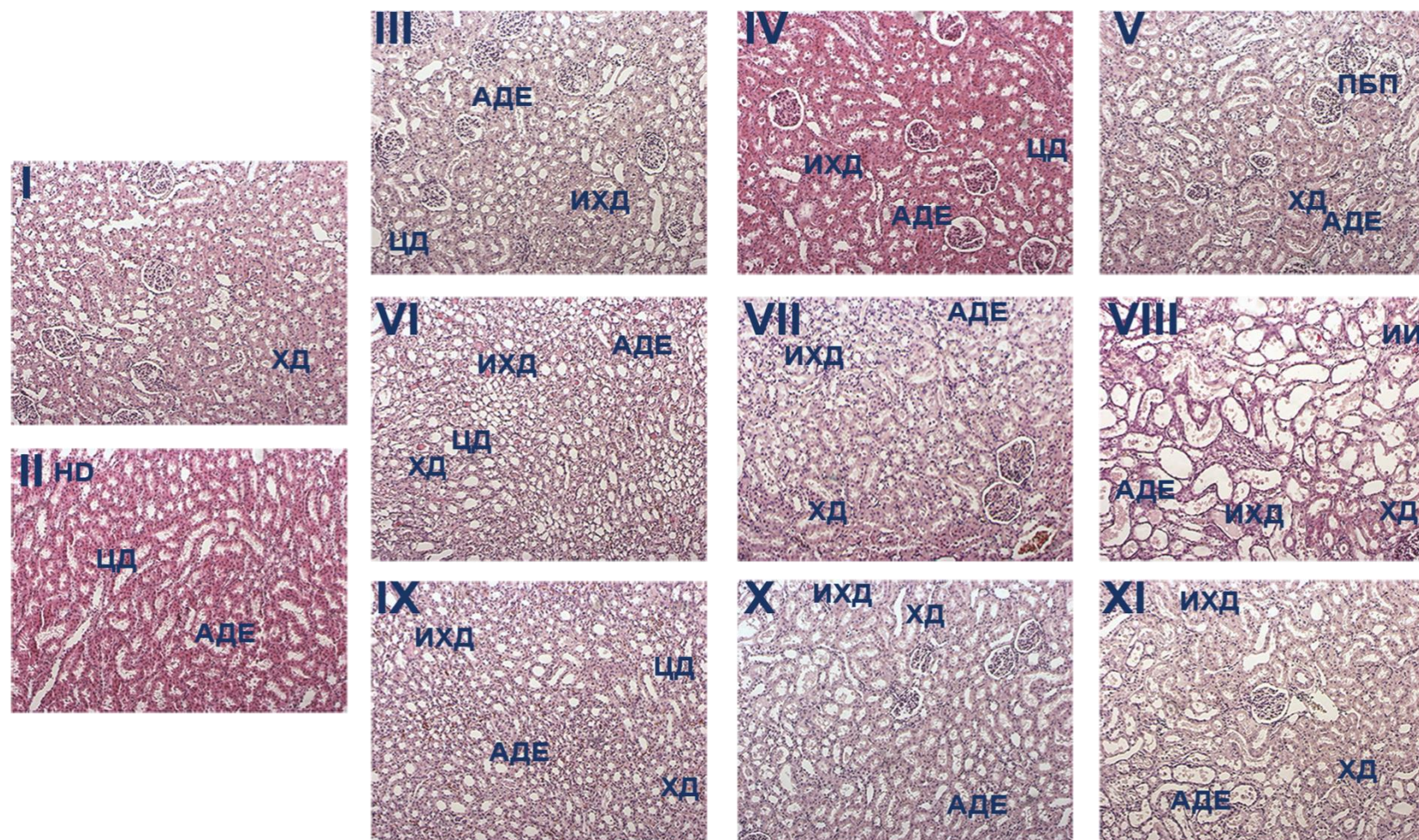
		Група животиња										
Морфолошка промена		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
Морфолошке промене у ткиву јетре	Хидропсна дегенерација хепатоцита	+	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+
	Фокална некроза	-	++	++	+	++	+	+	+	+	+	+
	Конфуентна некроза	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Лимфоцитни инфилтрат	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Хиперплазија Купферових ћелија	-	++	++	-/+	-	+	+	-	+	+	+
Морфолошке промене у ткиву бубрега	Проширење субкапсуларног Боумановог простора и атрофија гломерула	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
	Хидропсна дегенерација епитела каналића	+	++	++	+	++	++	++	+	+	+	+
	Атрофија и десквamacија покровног епитела каналића	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Цистична дилатација лумена каналића	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Интралуминални хијалини депозити	-	++	+	+	+	+	++	+	+	+	+
	Интерстицијални едем	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Дегенерација и атрофија семиниферних каналића	+	++	++	++	++	+	++	++	++	+	+
Морфолошке промене у ткиву тестиса	Дегенерација и интралуминална десквamacија Сертолијевих ћелија	-	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+
	Деплеција Лејдигових ћелија	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Легенда: - (одсуство промена), + (слаба промена), ++ (умерена промена), +++ (изражена промена). I - контрола (нетретирани група); II - цисплатина (7,5 mg/kg, *i.p.*), III - цисплатина + елагинска киселина (100 mg/kg), IV - цисплатина + АВН (50 mg/kg), V - цисплатина + АВН (100 mg/kg), VI - цисплатина + АВН (200 mg/kg), VII - цисплатина + АВК (50 mg/kg), VIII - цисплатина + АВК (100 mg/kg), IX - цисплатина + АВК (200 mg/kg), X - АВН *per se* (200 mg/kg) и XI - АВК *per se* (200 mg/kg)



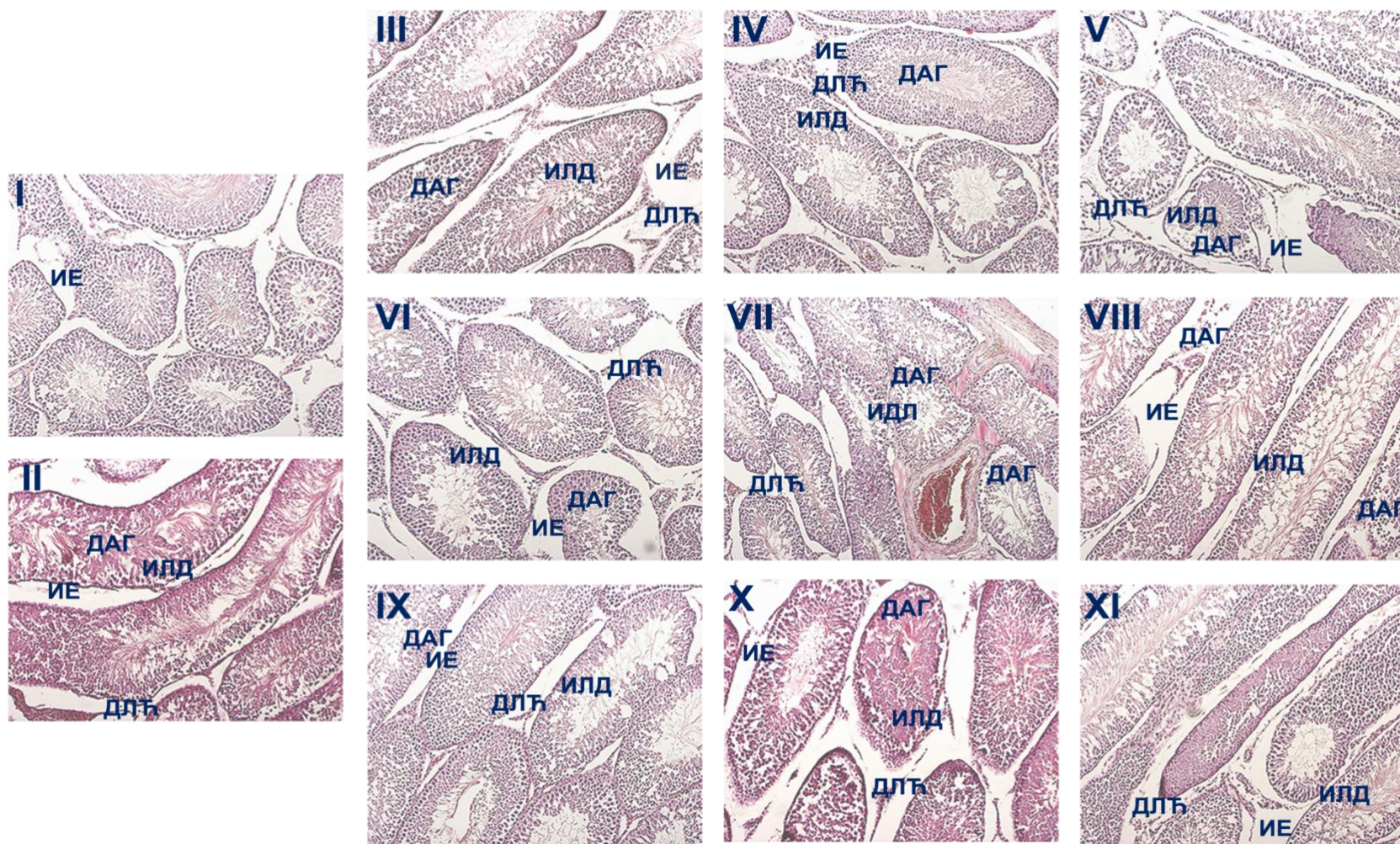
Слика 34. Хистопатолошка анализа исечака јетре животиња третираних цисплатином, елагинском киселином и екстрактима надземног дела и корена *A. vulgaris* снимљених након хематоксилин-еозин бојења при увећању од 100х.

Легенда: ЦВ - централна вена; ДС - дилатација синусоида; КН - конфлуентна некроза; ФН - фокална литичка некроза хепатоцита; ЛИ - лимфоцитни инфилтрат; ХД - хидропсна дегенерација хепатоцита; ХКТ - хиперплазија Купферових ћелија; Групе: I - контрола (нетретирана група); II - цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III - цисплатина + елагинска киселина (100 mg/kg), IV - цисплатина + АВН (50 mg/kg), V - цисплатина + АВН (100 mg/kg), VI - цисплатина + АВН (200 mg/kg), VII - цисплатина + АВК (50 mg/kg), VIII - цисплатина + АВК (100 mg/kg), IX - цисплатина + АВК (200 mg/kg), X - АВН *per se* (200 mg/kg) и XI - АВК *per se* (200 mg/kg).



Слика 35. Хистопатолошка анализа исечака ткива бубрега животиња третираних цисплатином, елагинском киселином и екстрактима надземног дела и корена *A. vulgaris* снимљених након хематоксилин-еозин бојења при увећању од 100х.

Легенда: ЦД – цистична дилатација тубула; АДЕ – атрофија и десквамација покровног епитела каналића; ХД – хидропсна дегенерација епитела каналића; ИХД – интралуминални хијалини депозити; ПБП – проширење субкапсуларног Боумановог простора; ИИ - интерстицијски инфилтрат. Групе: I – контрола (нетретирана група); II – цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III – цисплатина + елагинска киселина (100 mg/kg), IV – цисплатина + АВН (50 mg/kg), V-цисплатина + АВН (100 mg/kg), VI-цисплатина + АВН (200 mg/kg), VII – цисплатина + АВК (50 mg/kg), VIII – цисплатина + АВК (100 mg/kg), IX – цисплатина + АВК (200 mg/kg), X - АВН *per se* (200 mg/kg) и XI - АВК *per se* (200 mg/kg).



Слика 36. Хистопатолошка анализа исечака ткива тестиса животиња третираних цисплатином, елагинском киселином и екстрактами надземног дела и корена *A. vulgaris* снимљених након хематоксилин-еозин бојења при увећању од 100х.

Легенда: ДАГ – Дегенерација и атрофија герминативног епитела семиниферних каналића; ИЛД – дегенерација и интралуминална десквамација Сертолијевих ћелија; ИЕ – интерстицијумски едем; ДЛГ – деплеција Лејдигових ћелија. Групе: I – контрола (нетретирана група); II – цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III – цисплатина + елагинска киселина (100 mg/kg), IV – цисплатина + АВН (50 mg/kg), V – цисплатина + АВН (100 mg/kg), VI – цисплатина + АВН (200 mg/kg), VII – цисплатина + АВК (50 mg/kg), VIII – цисплатина + АВК (100 mg/kg), IX – цисплатина + АВК (200 mg/kg), X – АВН *per se* (200 mg/kg) и XI – АВК *per se* (200 mg/kg).

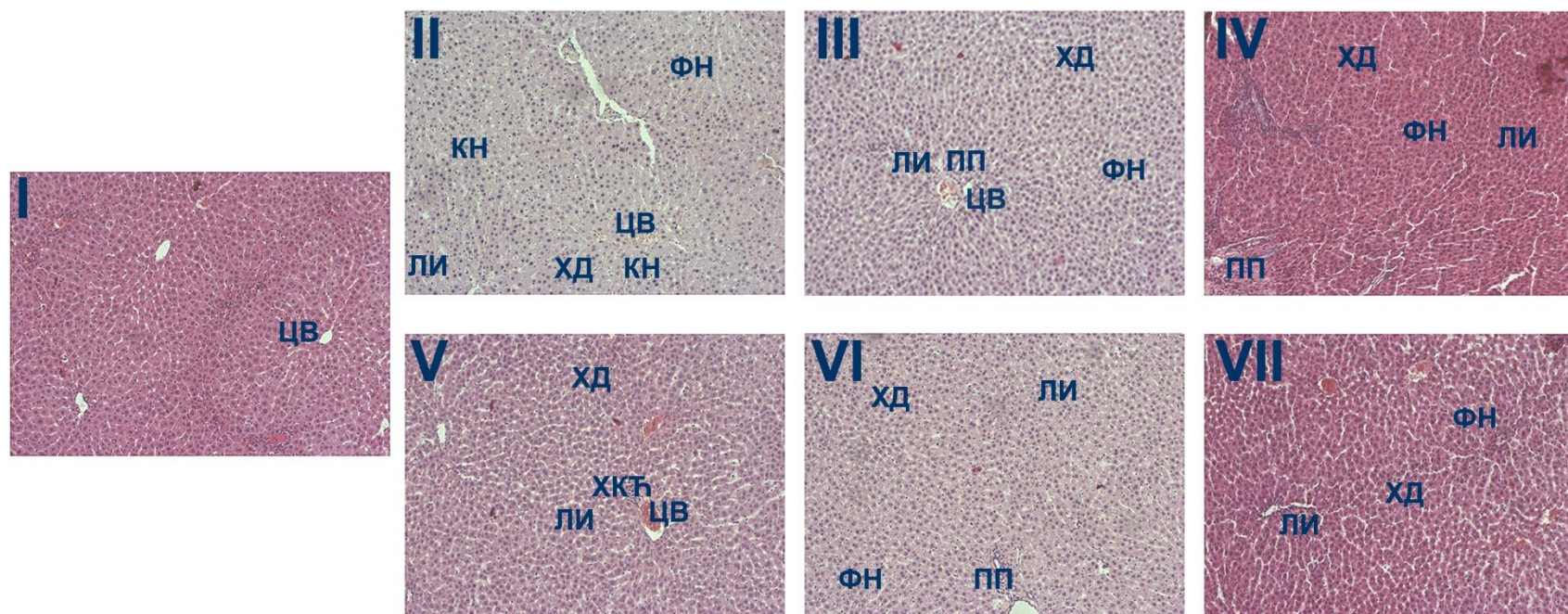
Преглед и интензитет промена уочених у ткивима јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња третираних екстрактом СХН у три различите дозе приказан је у Табели 17.

Табела 17. Збирне хистолошке промене у ткивним исечцима јетре, бубрега и тестиса експерименталних животиња приликом излагања цисплатини и третману екстрактима надземног дела и корена *S. hortensis*.

Морфолошка промена		Група животиња						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
Морфолошке промене у ткиву јетре	Хидропсна дегенерација хепатоцита	-	+++	+++	+	++	++	+
	Фокална некроза	-	++	++	+	+	+	+
	Конфуентна некроза	-	+	+	-	-	-	-
	Лимфоцитни инфилтрат	-	+	+	-	-	-	-
Морфолошке промене у ткиву бубрега	Проширење субкапсуларног Боумановог простора и атрофија гломерула	+	++	++	++	++	++	+
	Хидропсна дегенерација епитела каналића	+	+++	+++	++	+++	++	++
	Атрофија и десквamacија покровног епитела каналића	+	+++	+++	++	++	++	++
	Цистична дилатација лумена каналића	+	+	+	+	+	+	+
	Интралуминални хијалини депозити	+	+	++	+	+	+	+
	Интерстицијални едем	-	-	-	+	-	-	-
Морфолошке промене у ткиву тестиса	Дегенерација и атрофија семиниферних каналића	+	+++	+++	++	++	+++	++
	Дегенерација и интралуминална десквamacија Сертолијевих ћелија	+	+++	+++	++	++	+++	++
	Деплеција Лејдигових ћелија	+	+	+	+	+	+	+

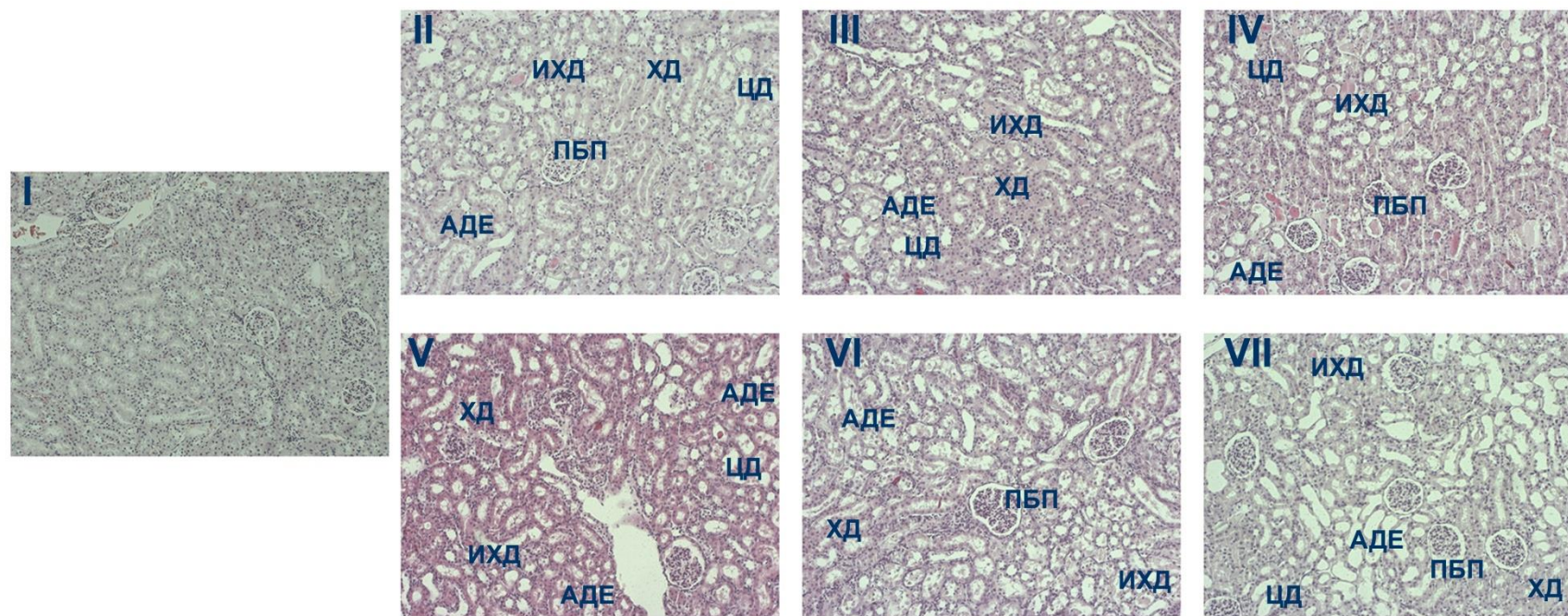
Легенда: - (одсуство промена), + (слаба промена), ++ (умерена промена), +++ (изражена промена). I – контрола (нетретирана група); II – цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III – цисплатина + СХН (50 mg/kg), IV – цисплатина + СХН (100 mg/kg), V – цисплатина + СХН (200 mg/kg), VI – цисплатина + симиларин (100 mg/kg), VII – СХН *per se* (200 mg/kg).

Приказани резултати показују да третман екстрактом СХН у дози од 100 mg/kg највише доприноси редуковању оштећења јетре, при чему се посебно истиче потпуно одсуство конfluентне некрозе и лимфоцитног инфилтрата. Ове две промене нису детектоване ни у осталим групама третираним екстрактом СХН, као ни силимарином, изузев III групе, која је примала екстракт СХН у најнижој дози (50 mg/kg) (Слика 37(III)).



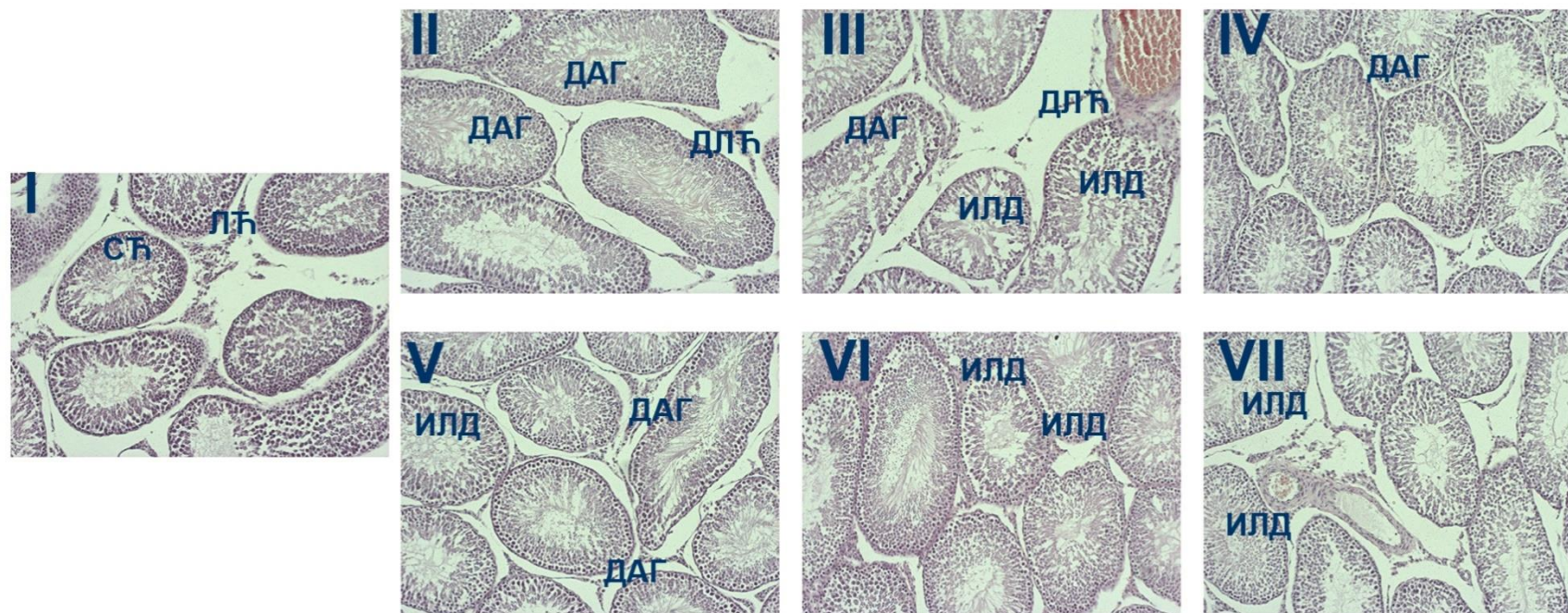
Слика 37. Хистопатолошка анализа исечака јетре животиња третираних цисплатином, силимарином и екстрактом надземног дела *S. hortensis* снимљених након хематоксилин-еозин бојења при увећању од 100х.

Легенда: ЦВ – централна вена; ПП – портни простор; КН – конфлуентна некроза; ФН – фокална литичка некроза хепатоцита; ЛИ – лимфоцитни инфилтрат; ХД – хидропсна дегенерација хепатоцита; ХКТ – хиперплазија Купферових ћелија. Групе: I – контрола (нетретирана група); II – цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III – цисплатина + CXN (50 mg/kg), IV – цисплатина + CXN (100 mg/kg), V – цисплатина + CXN (200 mg/kg), VI – цисплатина + силимарин (100 mg/kg), VII – CXN *per se* (200 mg/kg).



Слика 38. Хистопатолошка анализа исечака бубрега животиња третираних цисплатином, силимарином и екстрактом надземног дела *S. hortensis* снимљених након хематоксилин-еозин бојења при увећању од 100х.

Легенда: ЦД – цистична дилатација тубула; АДЕ – атрофија и десквамација покровног епитела каналића; ХД – хидропсна дегенерација епитела каналића; ИХД – интралуминални хијалини депозити; ПБП – проширење субкапсуларног Боумановог простора; ИИ – интерстицијски инфилтрат. Групе: I – контрола (нетретирана група); II – цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III – цисплатина + CXH (50 mg/kg), IV – цисплатина + CXH (100 mg/kg), V – цисплатина + CXH (200 mg/kg), VI – цисплатина + симиларин (100 mg/kg), VII – CXH *per se* (200 mg/kg).



Слика 39. Хистопатолошка анализа исечака тестиса животиња третираних цисплатином, силимарином и екстрактом надземног дела *S. hortensis* снимљених након хематоксилин-еозин бојења при увећању од 100х.

Легенда: Сћ – Сертолијеве ћелије; Лћ – Лејдигове ћелије; ДАГ – Дегенерација и атрофија герминативног епитела семиниферних каналића; ИЛД – дегенерација и интралуминална десквамација Сертолијевих ћелија; ИЕ – интерстицијумски едем; ДЛћ – деплеција Лејдигових ћелија. Групе: I – контрола (нетретирана група); II – цисплатина (7,5 mg/kg, i.p.), III – цисплатина + СХН (50 mg/kg), IV – цисплатина + СХН (100 mg/kg), V – цисплатина + СХН (200 mg/kg), VI – цисплатина + симиларин (100 mg/kg), VII – СХН *per se* (200 mg/kg).

Смањена хидропсна дегенерација и степен атрофије тубуларног епитела у ткиву бубрега уочени су у групама третираним СХН у дози од 100 mg/kg и силимарином. Међутим, када је реч о осталим оштећењима, није примећено значајно побољшање ткивне архитектуре у односу на групу која је примала цисплатину. Важно је, такође, истаћи да су умерене промене у реналном ткиву запажене и приликом самосталне апликације екстракта у току десет дана (Слика 38(VII)).

Категоризација промена у ткиву тестиса указује да се приликом примене екстракта СХН у средњој и највишој концентрацији репарирају оштећења тестиса, док те промене изостају приликом третмана силимарином и екстрактом СХН у дози од 50 mg/kg (Слика 39(VI, III)).

Хепатотоксичност узрокована цисплатином је и у другим студијама потврђена хистолошким анализама. Цисплатина примарно узрокује оштећења синусоида, крвних судова са улогом у транспорту кисеоника до јетре. Стога дилатација синусоида, васкуларна конгестија, као и хидропсна дегенерација представљају неке од најчешћих промена на нивоу јетре након излагања деловању цисплатине.⁴³⁸

Сагласно резултатима претходних студија, цисплатина изазива озбиљна морфолошка оштећења ткива. Као најчешћи облик нефротоксичности јавља се акутно оштећење бубрега, које је повезано са акутном некрозом проксималних тубуларних ћелија бубрега. Примарни токсични ефекат испољава се на бубрезима и то првенствено у кортикуларно-медуларном региону.⁴⁴⁹ Конкретније, нефротоксичност се највише примети у тубуларним епителним ћелијама унутрашњег кортекса, започињу сигналне каскадне реакције активације протеин киназа, започињања инфламаторних процеса путем ослобађања фактора некрозе тумора, као и различитих апоптотичких механизма. У проксималним тубулима, конкретније у S3 сегменту епителних ћелија, долази до највећег оштећења, будући да се преко овог сегмента излучује цисплатина.⁴⁵⁰ Разлог превелике осетљивости ових ћелија на цисплатину може се делимично објаснити њиховом метаболичком активношћу. Наиме, у ћелијама проксималних тубула одиграва се интензиван метаболизам, те се оне одликују великим бројем митохондрија. С тим у вези, позитивна корелација је уочена између токсичности цисплатине и броја митохондрија у различитим типовима ћелија.⁴⁵¹

Токсичност цисплатине на мушки репродуктивни систем манифестује се смањењем величине и тежине тестиса, губитком способности сазревања и дегенеративним променама (дегенерација, десквamacија и редукција) на герминативним ћелијама, укључујући и смањење њиховог броја.⁴⁵²⁻⁴⁵⁴ Поред тога, забележено је да примена цисплатине узрокује атрофију семиниферних каналића и дегенеративне

промене на базалној ламини, као и интерстицијални едем и капиларну конгестију.⁴⁵⁵ Негативни ефекти се испољавају и на полним ћелијама, редукујући број и нарушавајући покретљивост и морфологију сперматозоида, што последично може да води трајно нарушеном фертилитету мушкараца.⁴³⁹

Као што је претходно напоменуто, примарно место испољавања токсичног деловања цисплатине је ренални систем, где се цисплатина примарно акумулира у ћелијама епитела каналића проксималних бубрежних канала, проузрокујући на тај начин морфолошку дегенерацију ћелијских органела и некрозу ћелија, што даље води смањењу броја лизозома и митохондрија, формирању ДНК адуката, индуковању инфламаторних процеса, нарушавању синтезе протеина, редуковању нивоа GSH и израженијој липидној пероксидацији. GSH, заједно са тиопротеинима представља примарну одбрану ћелије од слобних радикала. Овај систем реагује директно са водоник-пероксидом редукујући га до воде, док се сам преводи у оксидовану форму (GSSG). На овај начин, ћелија се штити од процеса дезинтеграције ћелијске мембране услед липидне пероксидације. Апликација цисплатине делује на смањење нивоа редукованог глутатиона, што се објашњава заменом хлоридних јона интрацелуларним нуклеофилима, као што је –SH група. Поред тога, смањење ензимске активности супероксид-дисмутазе услед третмана цисплатином може да се јави и као последица смањене доступности цинка и бакра, који су есенцијални елементи неопходни за активност овог ензима.⁴⁵⁶

Бројна истраживања су спроведена са циљем испитивања механизма деловања антиоксиданата на побољшање општег статуса ткива приликом излагања деловању цисплатине. Иако прецизни механизми токсичног деловања цисплатине још увек нису познати, резултати добијени у овој дисертацији, као и подаци добијени у другим истраживачким групама указују да је у основи дегенеративних промена оксидативни стрес. Стога није изненађујуће што су истраживања агенаса који би допринели редуковању токсичних оштећења изазваних цисплатином усмерена на фитоједињења, као неке од најчешће испитиваних антиоксиданата.

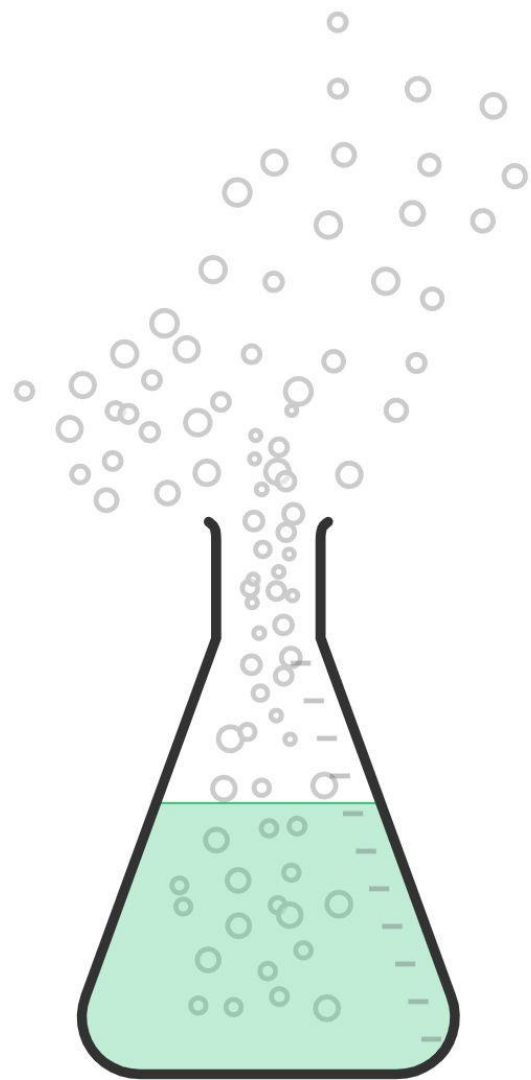
Извори природних производа показали су се као веома ефикасни у третманима различитих споредних ефеката које се догађају као последица изложености хемио- или радиотерапији.⁴⁵⁷ Томе значајно доприноси и податак да је изванредан синергистички антипролиферативни ефекат при комбинованој примени природних производа и конвенционалне терапије.⁴⁵⁸ Стога не изненађује све већа заинтересованост за биљне екстракте и производе секундарног метаболизма биљака у третману токсичности цисплатине.⁴⁵⁹

Сагласно резултатима ове студије, различитим експериментима је потврђено да елагинска киселина у различитим дозама показује позитивне ефекте на смањење токсичности ткива узроковане цисплатином.^{454,460,461} Орална примена рузмариנסке киселине, кључне компоненте екстракта чубра, показује значајан степен смањења медијатора апоптотичких процеса изазваних цисплатином у бубрезима глодара^{428,462}, па се може сматрати да је управо она одговорна за протективно деловање екстракта на смањење токсичности цисплатине, што је детектовано у овој дисертацији. Изразито смањење оксидативног стреса у бубрезима уклањањем хидроксиалкена 4-хидроксиноненала, једног од продуката липидне пероксидације у ткивима и биомаркера оксидативног стреса⁴⁶³, евидентирано је применом хлорогенске киселине у различитим дозама (3, 10 и 30 mg/kg). Поред тога, хесперидин, кверцетин и његов гликозид рутин протективно делују на нарушену редокс равнотежу у тестисима пацова приликом једнократног излагања деловању цисплатине у концентрацији 7 mg/kg.^{453,464,465} Кверцетин се такође показао и као једињење који би могло наћи примену у превенцији и третману оштећења митохондрија јетре изазваног цисплатином.⁴⁶⁶ Узимајући у обзир број идентификованих једињења у екстрактима биљака *A. vulgaris* и *S. hortensis* за које је добро познато да имају изражену способност неутрализације слободних радикала, показани антиоксидативни ефекат ових биљних врста могао би бити приписан способности ових једињења да директно неутралишу слободне радикале у организму настале применом цисплатине. Међутим, присутна једињења у екстрактима могу деловати и на повећање ефикасности ендогених антиоксидативних механизма путем утицаја на повећање синтезе редукованог глутатиона и ензима антиоксидативне заштите или утицањем на пораст других ендогених антиоксиданата.^{467,468}

Од три тестиране дозе, доза од 100 mg/kg се показала најефикаснијом у редуковању оксидативних оштећења ткива и нормализацији ткивне архитектуре и параметара очуваности функција органа у серуму. Иако се доза од 50 mg/kg показала као ефикасна, израженији биолошки одговор на већини параметара постиже се дозом од 100 mg/kg, имплицирајући да не можемо са сигурношћу проценити да ли доза од 50 mg/kg значајно побољшава општистатус ткива. Са друге стране, показало се да највиша тестирана доза екстракта није уједно и најефикаснија у смањењу токсичних ефеката цисплатине. Наиме, стиче се утисак да се при дозама вишим од 100 mg/kg јавља про-оксидативни ефекат фитоједињења, што је потврђено значајно мање израженим ефектом дозе од 200 mg/kg у поређењу са дозом од 100 mg/kg, сугеришући да се јавља одређени облик сатурације при дозама преко 100 mg/kg и да свако даље повећање дозе екстракта може испољавати смањену ефикасност. Међутим, поједини резултати добијени у овој

студији позивају на озбиљније разматрање доза које би потенцијално могле бити примењене у терапеутске сврхе. Примена екстракта *per se* у дози од 200 mg/kg може проузроковати одређене морфолошке промене у ткивима, као и алтерације у појединим функционалним параметрима, пре свега на нивоу бубрега и репродуктивних органа мужјака пацова. Иако ове промене нису изражене и не представљају озбиљна оштећења реналног и репродуктивног система, јасно је да би дозе екстракта, примењиване у циљу превенције и третмана болести узрокованих оксидативним стресом, требало да буду ниже од 200 mg/kg, како би се предупредили сви могући негативни ефекти на нивоу здравих ткива. Имајућу у виду ове податке, будућа истраживања би имала за циљ да се додатно спроведе низ студија са детаљнијим испитивањем ћелијских механизма и молекулских основа којима се одигравају промене у ткиву аплицирањем екстракта, као и анализом ширег спектра параметара функције органа, укључујући и праћење метаболита цисплатине. Такође, тестирање антиоксидативног дејства *A. vulgaris* и *S. hortensis* у ко-третману са другим хемиотерапеутицима је од значаја за ширу слику о потентности екстракта и могућности њиховог коришћења у комбинованим терапијским приступима. Иако подаци из литературе указују да примена екстракта лековитог биља не нарушава цитотоксичну активност хемиотерапеутика и да, напротив, делују као стимулатори активности антитуморских агенаса, ток будућих експеримената може да буде усмерен ка испитивању да ли дефинисана терапијска доза екстракта не нарушава антиканцерогени ефекат цисплатине или неких других лекова. Базирајући се на резултатима добијеним у овој дисертацији, а који показују обећавајући ефекат екстракта у спречавању оксидативних оштећења органа, као и спровођењем поменутих експеримената у будућности, омогућило би се добијање поузданих података о прецизним дозама које испољавају протективно деловање у стањима болести узрокованих оксидативним стресом, а које не изазивају негативне споредне ефекте на здравим ткивима.

Закључак



Информације које пружа ова дисертација обухватају савремене спектрофотометријске и хроматографске анализе хемијског састава и различитих видова биолошке активности: *in vitro* антиоксидативне, антимикробне и антиинфламаторне активности екстракта биљака *Alchemilla vulgaris* и *Satureja hortensis*. Поред тога, анализирана је биокомпатибилност екстракта са здравим ћелијама коже, као и *in vivo* протективни ефекат на смањење оксидативних оштећења јетре, бубрега и тестиса изазваних цисплатином. Базирајући се на резултатима спроведених студија, изводе се следећи закључци:

✿ Хроматографијом високих перформанси, као и спектрофотометријским методама, показано је да екстракти надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis* садрже високе концентрације фенолних једињења, међу којима је идентификовано преко 20 различитих једињења из група фенолних киселина и флавоноида. Екстракт надземног дела вирка одликује се високим садржајем елагинске киселине, као и нешто нижим концентрацијама флаван-3-ола катехина и његовог деривата катехин-галата. У екстракту корена *A. vulgaris* установљено је да је катехин доминантно једињење, пропраћен нешто нижим концентрацијама елагинске киселине и катехин-галата. Хидроксициметне киселине, пре свега рузмаринска и кафеинска киселина, као и флаванон нарингенин представљају најзаступљеније компоненте у метанолном екстракту надземног дела *S. hortensis*. Базирајући се на добијеним подацима, вирак и чубар се могу сматрати добрим изворима елагинске, односно рузмаринске киселине, за које је научно потврђено да доприносе израженом биолошком одговору екстракта, као што су антиоксидативна и антимикробна активност. Спектрофотометријским одређивањима различитих класа фенолних једињења установљено је да АВН, АВК и СХН садрже висок проценат фенолних једињења, а да су нарочито богати кондензованим танинима и фенолним киселинама. Сходно добијеним резултатима, тестирани екстракти могу бити сврстани у потенцијалне изворе фармаколошки активних компонената, будући да је доказано да присуство деривата бензоеве и циметне киселине и флавоноида у људској исхрани испољава бенефите на нивоу целокупног организма, пре свега путем превенције и/или редуковања широког дијапазона болести.

✿ *In vitro* тестовима антиоксидативне активности показано је да сва три екстракта испољавају снажан потенцијал неутрализације слободних радикала и то при

концентрацијама које одговарају стандардним фенолним једињењима или синтетичким антиоксидантима. Поред тога, показано је да ови екстракти у великој мери инхибирају процесе липидне пероксидације. Сходно представљеним резултатима, важно је истаћи да испитивани екстракти могу бити од великог значаја у превенцији и третману обољења чија је патофизиолошка основа оксидативни стрес, као што су кардиваскуларна обољења, дијабетес и неуродегенеративна обољења. Са друге стране, захваљујући добијеним подацима, отвара се могућност да и вирак и чубар буду разматрани и као потенцијални конзерванси у козметичкој, фармацеутској и прехранбеној индустрији, чиме би се у великој мери редуковала примена синтетских антиоксиданата, чија је безбедност веома често предмет дискусије.

✿ Микродилуционом методом је показано да сва три испитивана екстракта поседују умерену до слабу антибактеријску активност са МИК вредностима у распону 0,156 - 10 mg/mL. Уочено је да су Грам позитивне бактерије осетљивије на деловање екстраката *A. vulgaris* и *S. hortensis*. Када је реч о деловању екстраката на раст плесни и квасаца, тестирани екстракти су се показали неефикасним у спречавању раста гљивица, што је евидентирано изузетно високим МИК концентрацијама. Иако ови резултати нису обећавајући и не указују да би анализирани екстракти могли бити примењени као алтернатива антибиотицима или фунгицидима, ипак би требало оставити отвореним питање да ли би примена антимикуробних агенаса заједно са овим екстрактима могла довести до тога да се антимикуробно деловање комерцијалних препарата учини ефикаснијим при нижим дозама.

✿ Испитивањем инхибиције активности циклооксигеназа показано је да сва три екстракта инхибирају обе изоформе циклооксигеназе, и COX-1 и COX-2, при чему се израженији ефекат постиже на нивоу COX-2. Анализом експресије гена за COX-2 откривено је да екстракт СХН, у одређеном степену, испољава антиинфламаторно деловање путем инхибиције NfκB сигналног пута, док резултати добијени за екстракте АВН и АВК указују да су у механизам антиинфламаторног деловања ова два екстракта укључени други механизми и сигнални путеви. Овакви резултати указују да тестирани екстракти поседују инхибиторни потенцијал на нивоу циклооксигеназа, али да, примењени самостално, не испољавају ефекат у рангу антиинфламаторних лекова. Међутим,

узимајући у обзир негативне ефекте комерцијално доступних противупалних препарата, добијени резултати ипак указују на то да ове две биљке поседују антиинфламаторни потенцијал и да би могле бити употребљене као компоненте фармацеутских препарата са противзапаљенским деловањем.

✿ Испитивањем деловања екстраката надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis* на пролиферацију кератиноцита и фибробласта уочено је да испитивани узорци не проузрокују спречавање раста здравих ћелија, те да су у потпуности биокомпатибилни са њима. Тиме је потврђено да су наведени екстракти безбедни за употребу и да не нарушавају хомеостазу тестираних ћелија. Надовезујући се на претходна истраживања, а узимајући у обзир једињења присутна у анализираним екстрактима, отворена је могућност да *A. vulgaris* и *S. hortensis* буду примењени у виду козметичких формулација са циљем регенеративног ефекта на нивоу епителног ткива.

✿ Екстракти надземног дела и корена *A. vulgaris* и надземног дела *S. hortensis* у дозама од 50, 100 и 200 mg/kg показују протективно деловање на оксидативна оштећења јетре, бубрега и тестиса изазвана цисплатином. Примећена је тенденција нормализације биохемијских параметара оштећења органа у серуму (приликом ко-третмана са екстрактима, при чему се за сва три екстракта најефикаснијом показала доза од 100 mg/kg телесне масе животиња. Третман екстрактима доводи до значајног повећања активности SOD, CAT и GSH, те смањења нивоа TBARS у ткиву јетре, бубрега и тестиса, као и репарације морфолошких промена у односу на групу која је примала цисплатину. Најефикаснијом се показала доза од 100 mg/kg за сва три екстракта. Апликација екстраката *per se* у највећој тестираној концентрацији (200 mg/kg) узрокује благе промене на нивоу бубрега и тестиса, што је евидентирано првенствено смањењем активности одређених ендогених оксидативних параметара и израженијим морфолошким променама у односу на контролну групу.

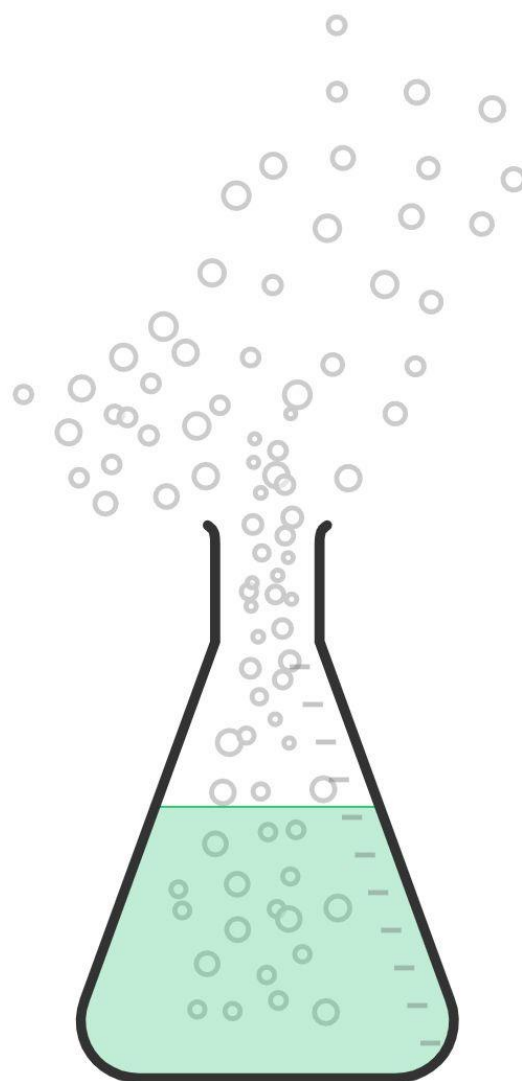
На основу свега предоченог, може се тврдити да се испитиване биљне врсте карактеришу високим садржајем фенолних једињења и њиховом снажном биолошком активношћу у *in vitro* и *in vivo* условима. По први пут су научној јавности представљени подаци који се односе на фитохемијски профил и биолошки потенцијал корена *A. vulgaris*. Поред тога, по први пут је показана њихова биокомпатибилност са ћелијама

коже, као и потенцијал вирка и чубра да смање акутна оксидативна оштећења јетре, бубрега и тестиса након излагања деловању цисплатине.

Иако су *A. vulgaris* и *S. hortensis* вековима од етнофармаколошког значаја, резултати ове дисертације у великој мери доприносе проширењу научних знања о њиховој биолошкој активности и хемијском профилу, што води отварању нових могућности за ширу, до сада непознату примену ових биљака. Вирак и чубар су, захваљујући високим концентрацијама специфичних група фенолних једињења погодни као полазни материјал за изоловање биолошки и фармаколошки активних материја. Нарочит фокус би требало усмерити на антиоксидативна једињења у екстрактима, узимајући у обзир висок степен антиоксидативног дејства испитаних екстраката, које је упоредиво или превазилази активност синтетских антиоксиданата. Како ове биљке могу бити од значаја у прехранбеној индустрији, пре свега у виду конзерванаса и на нивоу спречавања кварења намирница услед липидне пероксидације, даља истраживања би требало да се усмере на тестирање стабилности екстраката у различитим модел системима, као и при различитим термичким третманима, чиме би се са сигурношћу могло говорити о ширем пласману ових биљака у индустријске сврхе.

Такође, резултати добијени у овој дисертацији по први пут указују на *in vivo* потенцијал биљака *A. vulgaris* и *S. hortensis* да редукују оксидативна оштећења изазвана хемиотерапеутицима. Сходно томе, ове биљке могу бити корисне и у погледу будуће апликације у виду компонената нутрацеутика и/или дијететских суплемената, чија примена би се пре свега огледала у превенцији обољења узрокованих оксидативним стресом, одржавању нормалне хомеостазе организма, као и помоћним лековитим средствима у терапијама обољења хепатобилијарног и реналног система, као и тестиса. Поред тога, продубљивање тачних механизма њиховог деловања водило би расветљавању могућности евентуалне комбиноване примене са хемиотерапеутицима, у циљу смањења негативних деловања антитуморских агенаса. Поред тога, треба истаћи и важност појединачних компонената у екстрактима, па би продубљивање истраживања ових биљака обухватало експерименте који би укључили фракције екстраката богатије у садржају појединих група једињења и доминантних компонената у екстрактима ових биљака, чиме би се проценило да ли целокупан биопотенцијал биљке дугују једињењима које садрже у највећем проценту или пак више компонената синергистички доприноси специфичној активности. Овакав свеобухватни приступ би са сигурношћу допринео прецизнијем дефинисању ефикасних доза екстраката, чиме би се омогућило да *A. vulgaris* и *S. hortensis* буду део савремених медицинских третмана и клиничке праксе.

Литература



1. Dhami, N. Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines. *J. Herb. Med.* **3**, 123–131 (2013).
2. Gorunović, M. S. & Lukić, P. B. *Farmakognozija*. (Naša knjiga, 2001).
3. Butler, M. S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 162 (2005).
4. Chambers, C. S. *et al.* The silymarin composition... and why does it matter??? *Food Res. Int.* **100**, 339–353 (2017).
5. Daugan, M., Dufaÿ Wojcicki, A., d'Hayer, B. & Boudy, V. Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacol. Res.* **113**, 675–685 (2016).
6. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3670–95 (2013).
7. Amin, A., Gali-Muhtasib, H., Ocker, M. & Schneider-Stock, R. Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *Int. J. Biomed. Sci.* **5**, 1–11 (2009).
8. Mushtaq, S., Abbasi, B. H., Uzair, B. & Abbasi, R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. *EXCLI J.* **17**, 420–451 (2018).
9. Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S. & Hoyer, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today* **21**, 204–207 (2016).
10. Zahn, R., Perry, N., Perry, E. & Mukaetova-Ladinska, E. B. Use of herbal medicines: Pilot survey of UK users' views. *Complement. Ther. Med.* **44**, 83–90 (2019).
11. Hitl, M. *et al.* Herbal preparations use in prevention and treatment of gastrointestinal and hepatic disorders—Data from Vojvodina, Serbia. *Complement. Ther. Med.* **43**, 265–270 (2019).
12. Ekor, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Front. Pharmacol.* **4**, 177 (2014).
13. Fibigr, J., Šatínský, D. & Solich, P. Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts. *Anal. Chim. Acta* **1036**, 1–15 (2018).
14. Welz, A. N., Emberger-Klein, A. & Menrad, K. Why people use herbal medicine: insights from a focus-group study in Germany. *BMC Complement. Altern. Med.* **18**, 92 (2018).
15. DESMET, P. Health risks of herbal remedies: an update. *Clin. Pharmacol. Ther.* **76**, 1–17 (2004).
16. Zuin, V. G. & Vilegas, J. H. Pesticide residues in medicinal plants and phytomedicines. *Phytother. Res.* **14**, 73–88 (2000).
17. Yang, Y. *et al.* Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* **92**, 133–147 (2014).
18. Jordan, S. A., Cunningham, D. G. & Marles, R. J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **243**, 198–216 (2010).
19. Gilani, A. H. & Atta-ur-Rahman. Trends in ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 43–49 (2005).
20. Petrovska, B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* **6**, 1 (2012).
21. Shaban, N. S., Abdou, K. A. & Hassan, N. E.-H. Y. Impact of toxic heavy metals and pesticide residues in herbal products. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* **5**, 102–106

- (2016).
22. Ernst, E. & Pittler, M. H. Risks associated with herbal medicinal products. *Wien. Med. Wochenschr.* **152**, 183–9 (2002).
 23. Byeon, J.-H., Kil, J.-H., Ahn, Y.-C. & Son, C.-G. Systematic Review of Published Data on Herb Induced Liver Injury. *J. Ethnopharmacol.* (2019). doi:10.1016/J.JEP.2019.01.006
 24. Bansal, A., Chhabra, V., Rawal, R. K. & Sharma, S. Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization. *J. Pharm. Anal.* **4**, 223–233 (2014).
 25. Singh, S. K., Jha, S. K., Chaudhary, A., Yadava, R. D. S. & Rai, S. B. Quality control of herbal medicines by using spectroscopic techniques and multivariate statistical analysis. *Pharm. Biol.* **48**, 134–141 (2010).
 26. Lagunin, A. A. *et al.* Chemo- and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 1585–1611 (2014).
 27. Dias, D. A., Urban, S. & Roessner, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2**, 303–36 (2012).
 28. Tatić, B. & Blečić, V. *Sistematika i filogenija viših biljaka*. (Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, 1996).
 29. Josifović, M. *Flora SR Srbije IV*. (Srpska akademija nauka i umetnosti, 1972).
 30. Stamenković, V. *Naše neškodljive biljke*. (NIGP TREND, 2005).
 31. Tobyn, G., Denham, A. & Whitelegg, M. *The Western herbal tradition : 2000 years of medicinal plant knowledge*. (Churchill Livingstone/Elsevier, 2011).
 32. Medical Economics Company. *PDR for herbal medicines*. (Medical Economics Co, 2000).
 33. Treben, M. *Zdravlje iz božje apoteke : saveti i iskustva u lečenju lekovitih biljkama*. (Edicija, 2010).
 34. Li, B. *et al.* A large-scale chloroplast phylogeny of the Lamiaceae sheds new light on its subfamilial classification. *Sci. Rep.* **6**, 34343 (2016).
 35. Rustaiyan, A., Feizbakhsh, A., Masoudi, S. & Ameri, N. Comparison of the Volatile Oils of *Satureja atropatana* Bung. and *Satureja mutica* Fisch. et C.A. Mey. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* **16**, 594–596 (2004).
 36. Hassanzadeh, M. K., Tayarani Najaran, Z., Nasery, M. & Emami, S. A. Summer Savory (*Satureja hortensis* L.) Oils. *Essent. Oils Food Preserv. Flavor Saf.* 757–764 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-416641-7.00086-9
 37. Ioanvârban, D., Duda, M., Vârban, R. & Muntean, S. Research concerning the organic technology for *Satureja hortensis* L. culture. *Bull. UASVM Agric.* **66**, (2009).
 38. Sarić, M. *Lekovite biljke SR Srbije*. (SANU, 1989).
 39. Gostuški, R. *Lečenje lekovitih biljem*. (Narodna knjiga, 1979).
 40. Pichersky, E. & Gang, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* **5**, 439–45 (2000).
 41. S. Agostini-Costa, T. da, F., R., R., H., Silveira, D. & A., M. Secondary Metabolites. in *Chromatography and Its Applications* (InTech, 2012). doi:10.5772/35705
 42. Cheynier, V. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochem. Rev.* **11**, 153–177 (2012).

43. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. & Pouységu, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 586–621 (2011).
44. Leucuta, S., Vlase, L., Gocan, S., Radu, L. & Fodorea, C. Determination of Phenolic Compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **28**, 3109–3117 (2005).
45. Shahidi, F., Yeo, J., Shahidi, F. & Yeo, J. Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules* **21**, 1216 (2016).
46. Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V & Peralta, R. M. Phenolic compounds in fruits - an overview. *Int. J. Food Sci. Technol.* **47**, 2023–2044 (2012).
47. Rein, M. J. *et al.* Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75**, 588–602 (2013).
48. Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P. & Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**, 401–436 (1999).
49. Lattanzio, V. Phenolic Compounds: Introduction. in *Natural Products* 1543–1580 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-22144-6_57
50. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727–747 (2004).
51. Goleniowski, M., Bonfill, M., Cusido, R. & Palazón, J. Phenolic Acids. in *Natural Products* 1951–1973 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/978-3-642-22144-6_64
52. Stobiecki, M. & Kachlicki, P. Isolation and Identification of Flavonoids. in *The Science of Flavonoids* 47–69 (Springer New York, 2006). doi:10.1007/978-0-387-28822-2_2
53. Panche, A. N., Diwan, A. D. & Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **5**, e47 (2016).
54. Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P. & Casati, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.* **3**, 222 (2012).
55. Corradini, E. *et al.* Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Nat. Prod. Res.* **25**, 469–495 (2011).
56. Brazier-Hicks, M. *et al.* The C-glycosylation of flavonoids in cereals. *J. Biol. Chem.* **284**, 17926–34 (2009).
57. Heldt, H.-W., Piechulla, B., Heldt, H.-W. & Piechulla, B. Phenylpropanoids comprise a multitude of plant secondary metabolites and cell wall components. *Plant Biochem.* 431–449 (2011). doi:10.1016/B978-0-12-384986-1.00018-1
58. Yoshida, T., Amakura, Y. & Yoshimura, M. Structural Features and Biological Properties of Ellagitannins in Some Plant Families of the Order Myrtales. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 79–106 (2010).
59. Barreca, D., Smeriglio, A., Bellocco, E. & Trombetta, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects LINKED ARTICLES. *Br. J. Pharmacol.* **174**, 1244 (2017).
60. Khanbabaee, K. & Van Ree, T. Tannins: Classification and Definition. (2001). doi:10.1039/b101061l
61. Neagu, E., Paun, G., Albu, C. & Radu, G. L. Assessment of acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula*

- ulmaria* extracts. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **52**, 1–6 (2015).
62. Kaya, B., Menemen, Y. & Saltan, F. Z. Flavonoid compounds identified in *Alchemilla* L. species collected in the north-eastern Black Sea region of Turkey. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med. AJTCAM* **9**, 418–25 (2012).
63. D’Agostino, M., Dini, I., Ramundo, E. & Senatore, F. Flavonoid glycosides of *Alchemilla vulgaris* L. *Phyther. Res.* **12**, S162–S163 (1998).
64. Condrat, D. *et al.* Qualitative and quantitative analysis of gallic acid in *Alchemilla vulgaris*, *Allium ursinum*, *Acorus calamus* and *Solidago virga-aurea* by chip-electrospray ionization mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Central European Journal of Chemistry* **8**, 530–535 (2010).
65. Trendafilova, A., Todorova, M., Gavrilova, A. & Vitkova, A. Flavonoid glycosides from Bulgarian endemic *Alchemilla achtarowii* Pawl. *Biochem. Syst. Ecol.* **43**, 156–158 (2012).
66. Schimmer, O. & Eschelbach, H. Esculetin in *Alchemilla speciosa*: Identification and antimutagenic properties. *Pharmazie* **52**, 476–478 (1997).
67. Geiger, C., Scholz, E. & Rimpler, H. Ellagitannins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta*. *Planta Med.* **60**, 384–385 (1994).
68. Olafsdottir, E. S., Omarsdottir, S. & Jaroszewski, J. W. Constituents of three Icelandic *Alchemilla* species. *Biochem. Syst. Ecol.* **29**, 959–962 (2001).
69. Trendafilova, A., Todorova, M., Nikolova, M., Gavrilova, A. & Vitkova, A. Flavonoid constituents and free radical scavenging activity of *Alchemilla mollis*. *Nat. Prod. Commun.* **6**, 1851–1854 (2011).
70. Şeker Karatoprak, G., İlgün, S. & Koşar, M. Phenolic composition, anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. *Chem. Biodivers.* e1700150 (2017). doi:10.1002/cbdv.201700150
71. Vickery, M. L. & Vickery, B. Shikimic Acid Pathway Metabolites. in *Secondary Plant Metabolism* 157–182 (Macmillan Education UK, 1981). doi:10.1007/978-1-349-86109-5_6
72. Williams, D. J., Edwards, D., Pun, S., Chaliha, M. & Sultanbawa, Y. Profiling ellagic acid content: The importance of form and ascorbic acid levels. *Food Res. Int.* **66**, 100–106 (2014).
73. Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C. & Tomás-Barberán, F. A. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol. Aspects Med.* **31**, 513–539 (2010).
74. Nikolova, M., Dincheva, I., Vitkova, A. & Badjakov, I. Phenolic acids and free radical scavenging activity of Bulgarian endemic - *Alchemilla jumrukczalica* Pawl. *Planta Med.* **77**, PL73 (2011).
75. Møller, C., Hansen, S. H. & Cornett, C. Characterisation of tannin-containing herbal drugs by HPLC. *Phytochem. Anal.* **20**, 231–239 (2009).
76. Türk, M., Kaya, B., Menemen, Y. & Oğuztüzün, S. Apoptotic and necrotic effects of plant extracts belonging to the genus *Alchemilla* L. species on HeLa cells in vitro. *J. Med. Plants Res.* **5**, 4566–4571 (2011).
77. Felser, C. & Schimmer, O. Flavonoid glycosides from *Alchemilla speciosa*. *Planta Med.* **65**, 668–670 (1999).
78. Fraisse, D., Heitz, A., Carnat, A., Carnat, A. P. & Lamaison, J. L. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia* **71**, 463–4 (2000).

79. Lamaison, J. L., Carnat, A., Petitjean-Freytet, C. & Carnat, A. P. [Quercetin-3-glucuronide, main flavonoid of *Alchemilla*, *Alchemilla xanthochlora* Rothm. (Rosaceae)]. *Ann. Pharm. Fr.* **49**, 186–9 (1991).
80. Küpeli Akkol, E. *et al.* Phytochemical analyses and effects of *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. and *Alchemilla persica* Rothm. in rat endometriosis model. *Arch. Gynecol. Obstet.* (2015). doi:10.1007/s00404-015-3665-6
81. Babayan, M. S. & Chelombit'Ko, V. A. Amino acid and mineral compositions of *Alchemilla tredecimloba*. *Chem. Nat. Compd.* **43**, 241–242 (2007).
82. Ayaz, F. A., Ayirlioglu-Ayaz, S., Beyazoglu, O. & Beyazoglu, O. Fatty acid composition of leaf lipids of some *Alchemilla* L. (Rosaceae) species from Northeast Anatolia (Turkey). *Grasas y Aceites* **50**, 341–344 (1999).
83. Falchero, L. *et al.* Essential oil composition of lady's mantle (*Alchemilla xanthochlora* Rothm.) growing wild in Alpine pastures. *Nat. Prod. Res.* **23**, 1367–1372 (2009).
84. Trouillas, P. *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chem.* **80**, 399–407 (2003).
85. Kiselova, Y. *et al.* Correlation between the in vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Bulgarian herbs. *Phyther. Res.* **20**, 961–965 (2006).
86. Shrivastava, R., Cucuat, N. & John, G. W. Effects of *Alchemilla vulgaris* and glycerine on epithelial and myofibroblast cell growth and cutaneous lesion healing in rats. *Phyther. Res.* **21**, 369–373 (2007).
87. Shrivastava, R. & John, G. W. Treatment of aphthous stomatitis with topical *Alchemilla vulgaris* in glycerine. *Clin. Drug Investig.* **26**, 567–573 (2006).
88. Choi, J., Park, Y.-G., Yun, M.-S. & Seol, J.-W. Effect of herbal mixture composed of *Alchemilla vulgaris* and *Mimosa* on wound healing process. *Biomed. Pharmacother.* **106**, 326–332 (2018).
89. Takır, S. *et al.* Endothelium-dependent vasorelaxant effect of *Alchemilla vulgaris* methanol extract: a comparison with the aqueous extract in rat aorta. *Nat. Prod. Res.* **28**, 2182–2185 (2014).
90. Mandrone, M., Coqueiro, A., Poli, F., Antognoni, F. & Choi, Y. Identification of a Collagenase-Inhibiting Flavonoid from *Alchemilla vulgaris* Using NMR-Based Metabolomics. *Planta Med.* **84**, 941–946 (2018).
91. Jordão, A. M., Correia, A. C., DelCampo, R. & González SanJosé, M. L. Antioxidant capacity, scavenger activity, and ellagitannins content from commercial oak pieces used in winemaking. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 817–825 (2012).
92. Zeb, A. Ellagic acid in suppressing in vivo and in vitro oxidative stresses. *Mol. Cell. Biochem.* **448**, 27–41 (2018).
93. Kähkönen, M., Kylli, P., Ollilainen, V., Salminen, J.-P. & Heinonen, M. Antioxidant Activity of Isolated Ellagitannins from Red Raspberries and Cloudberries. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 1167–1174 (2012).
94. Ekambaram, S. P., Perumal, S. S. & Balakrishnan, A. Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent. *Phyther. Res.* **30**, 1035–1045 (2016).
95. Vicinanza, R., Zhang, Y., Henning, S. M. & Heber, D. Pomegranate Juice Metabolites, Ellagic Acid and Urolithin A, Synergistically Inhibit Androgen-Independent Prostate Cancer Cell Growth via Distinct Effects on Cell Cycle Control and Apoptosis. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2013**, 1–12 (2013).

96. Ríos, J.-L., Giner, R., Marín, M. & Recio, M. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. *Planta Med.* **84**, 1068–1093 (2018).
97. Zhao, M., Tang, S.-N., Marsh, J. L., Shankar, S. & Srivastava, R. K. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. *Cancer Lett.* **337**, 210–217 (2013).
98. Losso, J. N., Bansode, R. R., Trappey, A., Bawadi, H. A. & Truax, R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J. Nutr. Biochem.* **15**, 672–678 (2004).
99. Umesalma, S. & Sudhandiran, G. Differential Inhibitory Effects of the Polyphenol Ellagic Acid on Inflammatory Mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Rat Colon Carcinogenesis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **107**, 650–655 (2010).
100. Zhou, B., Li, Q., Wang, J., Chen, P. & Jiang, S. Ellagic acid attenuates streptozocin induced diabetic nephropathy via the regulation of oxidative stress and inflammatory signaling. *Food Chem. Toxicol.* **123**, 16–27 (2019).
101. Yoshimura, Y., Nishii, S., Zaima, N., Moriyama, T. & Kawamura, Y. Ellagic acid improves hepatic steatosis and serum lipid composition through reduction of serum resistin levels and transcriptional activation of hepatic ppara in obese, diabetic KK-Ay mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 486–491 (2013).
102. Polce, S. *et al.* Ellagic Acid Alleviates Hepatic Oxidative Stress and Insulin Resistance in Diabetic Female Rats. *Nutrients* **10**, 531 (2018).
103. Devipriya, N., Sudheer, A. R. & Menon, V. P. Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **21**, 621–630 (2007).
104. Mohtashami, S., Rowshan, V., Tabrizi, L., Babalar, M. & Ghani, A. Summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil constituent oscillation at different storage conditions. *Ind. Crops Prod.* **111**, 226–231 (2018).
105. Jafari, F. *et al.* A study on essential oil chemical compositions, antioxidant, and antimicrobial activities of native and endemic *Satureja* Species Growing in Iran. *Pharm. Chem. J.* **52**, 63–68 (2018).
106. Sefidkon, F. & Jamzad, Z. Chemical composition of the essential oil of three Iranian *Satureja* species (*S. mutica*, *S. macrantha* and *S. intermedia*). *Food Chem.* **91**, 1–4 (2005).
107. Skočibušić, M., Bezić, N. & Dunkić, V. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from *Satureja subspicata* Vis. growing in Croatia. *Food Chem.* **96**, 20–28 (2006).
108. Slavkovska, V., Jancic, R., Bojovic, S., Milosavljevic, S. & Djokovic, D. Variability of essential oils of *Satureja montana* L. and *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. from the central part of the Balkan peninsula. *Phytochemistry* **57**, 71–76 (2001).
109. Estaji, A., Roosta, H. R., Rezaei, S. A., Hosseini, S. S. & Niknam, F. Morphological, physiological and phytochemical response of different *Satureja hortensis* L. accessions to salinity in a greenhouse experiment. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **10**, 25–33 (2018).
110. Wesolowska, A., Grzeszczuk, M. & Jadczyk, D. Influence of distillation method on the content and composition of essential oil isolated from Summer Savory (*Satureja hortensis* L.). *J. Essent. Oil Bear. Plants* **18**, 215–221 (2015).
111. Najafian, S. & Zahedifar, M. Antioxidant activity and essential oil composition of *Satureja hortensis* L. as influenced by sulfur fertilizer. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 2404–2408 (2015).

112. Figueredo, G., Ünver, A., Chalchat, J. C., Arslan, D. & Özcan, M. M. A Research on the composition of essential oil isolated from some aromatic plants by microwave and hydrodistillation. *J. Food Biochem.* **36**, 334–343 (2012).
113. Farzaneh, M., Kiani, H., Sharifi, R., Reisi, M. & Hadian, J. Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **109**, 145–151 (2015).
114. Felšöciová, S. *et al.* Antifungal activity of essential oils against selected terverticillate penicillia. *Ann. Agric. Environ. Med.* **22**, 38–42 (2015).
115. Čavar, S., Maksimović, M., Šolić, M. E., Jerković-Mujkić, A. & Bešta, R. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. *Food Chem.* **111**, 648–653 (2008).
116. Güllüce, M. *et al.* In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3958–3965 (2003).
117. Katar, D. *et al.* Ecological variation of yield and aroma components of summer savory (*Satureja hortensis* L.). *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **7**, 131–135 (2017).
118. Alexa, E. *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial Potential of *Satureja hortensis* L. in Fresh Cow Cheese. *J. Food Qual.* **2018**, 1–10 (2018).
119. Sharifi, V., Hadjmohammadi, M. & Elyasi, H. Investigation of the existence of five major flavonoids in *Satureja sahendica* Bornm. and optimization of their extraction conditions using experimental design, solid phase extraction and HPLC. *Planta Med.* **77**, PA25 (2011).
120. Mihajilov-Krstev, T. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Open Life Sci.* **4**, 411–416 (2009).
121. Lesjak, M. *et al.* Binary and Tertiary Mixtures of *Satureja hortensis* and *Origanum vulgare* Essential Oils as Potent Antimicrobial Agents Against *Helicobacter pylori*. *Phyther. Res.* **30**, 476–484 (2016).
122. Şahin, F. *et al.* Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis* L. *J. Ethnopharmacol.* **87**, 61–65 (2003).
123. Sharifzadeh, A., Khosravi, A. R. & Ahmadian, S. Chemical composition and antifungal activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* isolates from buccal lesions of HIV+ individuals. *Microb. Pathog.* **96**, 1–9 (2016).
124. Hazrati, H., Saharkhiz, M. J., Niakousari, M. & Moein, M. Natural herbicide activity of *Satureja hortensis* L. essential oil nanoemulsion on the seed germination and morphophysiological features of two important weed species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **142**, 423–430 (2017).
125. Kemertelidze, É. P., Sagareishvili, T. G., Syrov, V. N. & Khushbaktova, Z. A. Chemical Composition and Pharmacological Activity of Garden Savory (*Satureja hortensis* L.) Occurring in Georgia. *Pharm. Chem. J.* **38**, 319–322 (2004).
126. Plánder, S. *et al.* Major antioxidant constituents from *Satureja hortensis* L. extracts obtained with different solvents. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114**, 772–779 (2012).
127. Vladimir-Knežević, S. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibitory, Antioxidant and Phytochemical Properties of Selected Medicinal Plants of the Lamiaceae Family. *Molecules* **19**, 767–782 (2014).

128. Zeljković, S. Č. *et al.* Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L. *Ind. Crops Prod.* **76**, 1094–1099 (2015).
129. Cetkovic, G. S., Mandic, A. I., Canadanovic-Brunet, J. M., Djilas, S. M. & Tumbas, V. T. HPLC screening of phenolic compounds in winter savory (*Satureja montana* L.) extracts. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **30**, 293–306 (2007).
130. Gohari, A. R. *et al.* Bioactive flavonoids from *Satureja atropatana* Bonge. *Nat. Prod. Res.* **23**, 1609–1614 (2009).
131. de Rojas, V., Somoza, B., Ortega, T. & Villar, A. Isolation of Vasodilatory Active Flavonoids from the Traditional Remedy *Satureja obovata*. *Planta Med.* **62**, 272–274 (2007).
132. Damašius, J. *et al.* Fast screening of the main phenolic acids with antioxidant properties in common spices using on-line HPLC/UV/DPPH radical scavenging assay. *Anal. Methods* **6**, 2774 (2014).
133. Mašković, P. *et al.* Summer savory extracts prepared by novel extraction methods resulted in enhanced biological activity. *Ind. Crops Prod.* **109**, 875–881 (2017).
134. Exarchou, V. *et al.* Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5294–9 (2002).
135. Skendi, A., Irakli, M. & Chatzopoulou, P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **6**, 62–69 (2017).
136. Abd El Tawab, A. M., Shahin, N. N. & AbdelMohsen, M. M. Protective effect of *Satureja montana* extract on cyclophosphamide-induced testicular injury in rats. *Chem. Biol. Interact.* **224**, 196–205 (2014).
137. Bektašević, M., Carev, I., Roje, M., Jurin, M. & Politeo, O. Phytochemical Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil and Extracts of *Satureja subspicata* Vis . Growing in Bosnia and Herzegovina. *Chem. Biodivers.* **14**, e1700239 (2017).
138. López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Švarc-Gajić, J., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: The case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. *J. Funct. Foods* **18**, 1167–1178 (2015).
139. Chkhikvishvili, I. *et al.* Rosmarinic acid-rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect Jurkat T cells against oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 456253 (2013).
140. Alonso-Carrillo, N. *et al.* Extraction of phenolic compounds from *Satureja macrostema* using microwave-ultrasound assisted and reflux methods and evaluation of their antioxidant activity and cytotoxicity. *Ind. Crops Prod.* **103**, 213–221 (2017).
141. Askun, T., Tumen, G., Satıl, F. & Karaarslan, D. Active constituents of some *Satureja* L. species and their biological activities. *African J. Microbiol. Res.* **6**, 4623–4633 (2012).
142. Moghadam, S. E. *et al.* Metabolite profiling for caffeic acid oligomers in *Satureja biflora*. *Ind. Crops Prod.* **76**, 892–899 (2015).
143. Štefan, M. B., Vuković Rodríguez, J., Blažeković, B., Kindl, M. & Vladimir-Knežević, S. Total Hydroxycinnamic Acids Assay: Prevalidation and Application on Lamiaceae Species. *Food Anal. Methods* **7**, 326–336 (2014).
144. Kraśniewska, K. *et al.* The use of pullulan coating enriched with plant extracts from *Satureja hortensis* L. to maintain pepper and apple quality and safety. *Postharvest Biol.*

- Technol.* **90**, 63–72 (2014).
145. Bahramikia, S., Yazdanparast, R. & Nosrati, N. A comparison of antioxidant capacities of ethanol extracts of *Satureja hortensis* and *Artemisia dracunculus* leaves. *Pharmacologyonline* **2**, 694704- (2008).
 146. Madsen, H. L., Andersen, L., Christiansen, L., Brockhoff, P. & Bertelsen, G. Antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in minced, cooked pork meat. *Zeitschrift für Leb. und -forsch.* **203**, 333–338 (1996).
 147. Aksu, M. I. & Özer, H. Effects of lyophilized water extract of *Satureja hortensis* on the shelf life and quality properties of ground beef. *J. Food Process. Preserv.* **37**, 777–783 (2013).
 148. Behravan, J., Mosafa, F., Karimi, G. . & Iranshahi, M. In vitro protective effects of *Satureja hortensis* L. essential oil and ethanolic extract on lymphocytes dna. **6**, 64–70 (2007).
 149. Yazdanparast, R. & Shahriyary, L. Comparative effects of *Artemisia dracunculus*, *Satureja hortensis* and *Origanum majorana* on inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion. *Vascul. Pharmacol.* **48**, 32–37 (2008).
 150. Tepe, B. & Sokmen, A. Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. *Nat. Prod. Res.* **21**, 1133–1144 (2007).
 151. Petersen, M. & Simmonds, M. S. J. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* **62**, 121–5 (2003).
 152. Chen, J. H. & Ho, C.-T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem* **45**, 2374–2378 (1997).
 153. Lu, Y. & Yeap Foo, L. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* **75**, 197–202 (2001).
 154. Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F. & Firuzi, O. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure- Activity Relationships. *Curr. Med. Chem.* **20**, 4436–4450 (2013).
 155. Rocha, J. *et al.* Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **116**, 398–413 (2015).
 156. Rahbardar, M. G., Amin, B., Mehri, S., Mirnajafi-Zadeh, S. J. & Hosseinzadeh, H. Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: An evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Phytomedicine* **40**, 59–67 (2018).
 157. Swamy, M. K., Sinniah, U. R. & Ghasemzadeh, A. Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 7775–7793 (2018).
 158. Cornejo, A. *et al.* Rosmarinic acid prevents fibrillization and diminishes vibrational modes associated to β sheet in tau protein linked to Alzheimer's disease. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **32**, 945–953 (2017).
 159. Niemetz, R. & Gross, G. G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* **66**, 2001–2011 (2005).
 160. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition* (John Wiley and Sons, 2009).
 161. Ghosh, S., Chisti, Y. & Banerjee, U. C. Production of shikimic acid. *Biotechnol. Adv.*

- 30**, 1425–1431 (2012).
162. Niemetz, R. & Gross, G. G. Oxidation of pentagalloylglucose to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves. *Phytochemistry* **62**, 301–306 (2003).
163. Espín, J. C., Larrosa, M., García-Conesa, M. T. & Tomás-Barberán, F. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* **2013**, 270418 (2013).
164. Tomás-Barberán, F. A. *et al.* Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1500901 (2017).
165. Landete, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* **44**, 1150–1160 (2011).
166. García-Niño, W. R. & Zazueta, C. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. *Pharmacol. Res.* **97**, 84–103 (2015).
167. Tomás-Barberán, F. A. *et al.* Urolithins, the rescue of “old” metabolites to understand a “new” concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1500901 (2017).
168. Grayer, R. J. *et al.* The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry* **64**, 519–528 (2003).
169. García-Villalba, R., Beltrán, D., Espín, J. C., Selma, M. V. & Tomás-Barberán, F. A. Time Course Production of Urolithins from Ellagic Acid by Human Gut Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8797–8806 (2013).
170. Petersen, M. *et al.* Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 1663–1679 (2009).
171. Tzin, V. & Galili, G. The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arab. B.* **8**, e0132 (2010).
172. Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M. & Terao, J. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. *Life Sci.* **75**, 165–178 (2004).
173. Nabavi, S. M. *et al.* Flavonoid biosynthetic pathways in plants: Versatile targets for metabolic engineering. *Biotechnol. Adv.* (2018). doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2018.11.005
174. Farag, M. A., Huhman, D. V, Dixon, R. A. & Sumner, L. W. Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* **146**, 387–402 (2008).
175. Wei, K. *et al.* Transcriptome Analysis Reveals Key Flavonoid 3'-Hydroxylase and Flavonoid 3',5'-Hydroxylase Genes in Affecting the Ratio of Dihydroxylated to Trihydroxylated Catechins in *Camellia sinensis*. *PLoS One* **10**, e0137925 (2015).
176. Feng, H. *et al.* Analysis of flavonoids and the flavonoid structural genes in brown fiber of upland cotton. *PLoS One* **8**, e58820 (2013).
177. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report Early Implementation. (2018).
178. Fernández, L. & Hancock, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins

- and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 661–81 (2012).
179. Wiederhold, N. P. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect. Drug Resist.* **10**, 249–259 (2017).
180. Zhang, G. & Feng, J. The intrinsic resistance of bacteria. *Yi chuan = Hered.* **38**, 872–880 (2016).
181. Dina, J., Malbruny, B. & Leclercq, R. Nonsense mutations in the *lsa*-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and Streptogramins A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2307–9 (2003).
182. Poole, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* **39**, 162–176 (2007).
183. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 20–51 (2005).
184. Koebnik, R., Locher, K. P. & Van Gelder, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**, 239–53 (2000).
185. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J. & Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* (2018). doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2018.11.013
186. Sultan, I. *et al.* Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Front. Microbiol.* **9**, 2066 (2018).
187. Srinivasan, A., Lopez-Ribot, J. L. & Ramasubramanian, A. K. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov. Today. Technol.* **11**, 65–71 (2014).
188. van Hoek, A. H. A. M. *et al.* Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* **2**, 203 (2011).
189. Cowen, L. E., Sanglard, D., Howard, S. J., Rogers, P. D. & Perlin, D. S. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **5**, a019752 (2014).
190. The antibiotic alarm. *Nature* **495**, 141–141 (2013).
191. Sandoval-Motta, S. & Aldana, M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **8**, 253–267 (2016).
192. Dyakov, Y. T. (Yuri T. ., Dzhevakhia, V. G. (Vitaly G. . & Korpela, T. *Comprehensive and molecular phytopathology*. (Elsevier, 2007).
193. Kišgeci, J. *Lekovite i aromatične biljke*. (Partenon (Beograd), Srpska književna zadruga (Beograd), 2008).
194. Lewis, K. & Ausubel, F. M. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1504–1507 (2006).
195. Abreu, A. C., McBain, A. J. & Simões, M. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1007 (2012).
196. Abadi, A. T. B. Strategies used by helicobacter pylori to establish persistent infection. *World J. Gastroenterol.* **23**, 2870–2882 (2017).
197. Mohammadi, A., Nazari, H., Imani, S. & Amrollahi, H. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. *J. Mycol. Med.* **24**, e1–e8 (2014).
198. Waller, S. B. *et al.* Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. *Microb. Pathog.* **104**, 232–237 (2017).
199. Petrović, N. V. *et al.* Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of *Thymus praecox* supercritical extracts. *J. Supercrit. Fluids* **110**, 117–125 (2016).

200. Blagojević, P., Radulović, N., Palić, R. & Stojanović, G. Chemical Composition of the Essential Oils of Serbian Wild-Growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. (2006). doi:10.1021/JF060123O
201. Mun, S.-H. *et al.* Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine* **20**, 714–718 (2013).
202. Shibata, H. *et al.* Alkyl Gallates, Intensifiers of β -lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 549–555 (2005).
203. Shimizu, M. *et al.* Marked potentiation of activity of β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3198–3201 (2001).
204. Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S. & Xu, X. Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of dna gyrase. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8185–8190 (2013).
205. Batovska, D. *et al.* Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *Eur. J. Med. Chem.* **44**, 2211–2218 (2009).
206. Ávila, H. P., Smânia, E. de F. A., Monache, F. D. & Smânia, A. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 9790–9794 (2008).
207. Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **38**, 99–107 (2011).
208. Alves, M. J. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 346–357 (2013).
209. Cueva, C. *et al.* Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res. Microbiol.* **161**, 372–382 (2010).
210. Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Brock, T. D. *Brock biology of microorganisms*. (Pearson Prentice Hall, 2006).
211. Liu, I. X., Durham, D. G. & Richards, R. M. Baicalin synergy with β -lactam antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and other β -lactam-resistant strains of *S. aureus*. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**, 361–6 (2000).
212. Hu, Z.-Q. *et al.* Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 558–60 (2002).
213. Eumkeb, G., Sakdarat, S. & Siri Wong, S. Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine* **18**, 40–45 (2010).
214. Kuok, C.-F. *et al.* Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **242**, 731–743 (2017).
215. Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K. & Doble, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* **15**, 639–652 (2008).
216. Stefanović, O. & Comic, L. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. *J. Appl. Pharm. Sci.* **02**, 1–5 (2012).
217. Lima, V. N. *et al.* Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microb. Pathog.* **99**, 56–61 (2016).

218. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84 (2007).
219. Bartz, R. R. & Piantadosi, C. A. Clinical review: oxygen as a signaling molecule. *Crit. Care* **14**, 234 (2010).
220. Bratic, A. & Larsson, N.-G. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123**, 951–957 (2013).
221. Loschen, G., Flohé, L. & Chance, B. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.* **18**, 261–264 (1971).
222. Nohl, H. & Hegner, D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur. J. Biochem.* **82**, 563–7 (1978).
223. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. (Oxford University Press, 2015). doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001
224. Dickinson, B. C. & Chang, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 504–11 (2011).
225. Trostchansky, A. *et al.* Nitric Oxide Redox Biochemistry in Lipid Environments. *Nitric Oxide* 27–60 (2010). doi:10.1016/B978-0-12-373866-0.00002-2
226. Wiseman, A. Dietary alkyl thiol free radicals (RSS) can be as toxic as reactive oxygen species (ROS). *Med. Hypotheses* **63**, 667–670 (2004).
227. Nimse, S. B. & Pal, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* **5**, 27986–28006 (2015).
228. Barbusiński, K. Fenton reaction-controversy concerning the chemistry reakcja fentona-kontrowersje dotyczące chemizmu. *Ecol. Chem. Engineering S* **16**, 347–358 (2009).
229. Xie, Z.-Z., Liu, Y. & Bian, J.-S. Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–12 (2016).
230. Raha, S. & Robinson, B. H. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am. J. Med. Genet.* **106**, 62–70 (2001).
231. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1147–1150 (2007).
232. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**, 118–26 (2010).
233. Poprac, P. *et al.* Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 592–607 (2017).
234. Sies, H. & Jones, D. Oxidative Stress. *Encycl. Stress* 45–48 (2007). doi:10.1016/B978-012373947-6.00285-3
235. Lushchak, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* **101**, 13–30 (2011).
236. Rahal, A. *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed Res. Int.* **2014**, 761264 (2014).
237. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2002).
238. Quinzii, C. M. *et al.* Tissue-specific oxidative stress and loss of mitochondria in CoQ-deficient Pdss2 mutant mice. *FASEB J.* **27**, 612–21 (2013).
239. Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224**, 164–175 (2014).

240. Barnham, K. J., Masters, C. L. & Bush, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 205–214 (2004).
241. Csányi, G. *et al.* Thrombospondin-1 Regulates Blood Flow via CD47 Receptor–Mediated Activation of NADPH Oxidase 1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2966–2973 (2012).
242. Carocho, M., Ferreira, I. C. F. R., Morales, P. & Soković, M. Antioxidants and prooxidants: effects on health and aging. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 1–2 (2018).
243. Ighodaro, O. M. & Akinloye, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* (2017). doi:10.1016/J.AJME.2017.09.001
244. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
245. Willett, W. C. The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr.* **9**, 105–10 (2006).
246. Oroian, M. & Escriche, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Res. Int.* **74**, 10–36 (2015).
247. Poljsak, B. & Milisav, I. The Neglected Significance of “Antioxidative Stress”. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 1–12 (2012).
248. Cunha, L. C. M. *et al.* Natural antioxidants in processing and storage stability of sheep and goat meat products. *Food Res. Int.* **111**, 379–390 (2018).
249. Regnier, T., Combrinck, S. & Du Plooy, W. Essential oils and other plant extracts as food preservatives. in *Progress in Food Preservation* 539–579 (Wiley-Blackwell, 2012). doi:10.1002/9781119962045.ch26
250. Shan, B., Cai, Y.-Z., Brooks, J. D. & Corke, H. Potential Application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. *J. Med. Food* **14**, 284–290 (2011).
251. Xu, D.-P. *et al.* Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
252. Ali, S. S. *et al.* Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Res. Int.* **41**, 1–15 (2008).
253. Zheng, W. & Wang, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5165–70 (2001).
254. Use of rosemary extracts as a food additive - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. *EFSA J.* **6**, 721 (2008).
255. Fernando, I. P. S., Kim, M., Son, K.-T., Jeong, Y. & Jeon, Y.-J. Antioxidant Activity of Marine Algal Polyphenolic Compounds: A Mechanistic Approach. *J. Med. Food* **19**, 615–628 (2016).
256. Seyoum, A., Asres, K. & El-Fiky, F. K. Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* **67**, 2058–2070 (2006).
257. Wolfe, K. L. & Liu, R. H. Structure–Activity Relationships of Flavonoids in the Cellular Antioxidant Activity Assay. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 8404–8411 (2008).
258. Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D. & Trinajstić, N. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croat. Chim. Acta* **76**, 55–61 (2003).
259. Dai, J. & Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant

- and Anticancer Properties. *Molecules* **15**, 7313–7352 (2010).
260. Leopoldini, M., Russo, N. & Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* **125**, 288–306 (2011).
261. Markovic, Z. Study of the mechanisms of antioxidative action of different antioxidants. *J. Serbian Soc. Comput. Mech.* **10**, 135–150 (2016).
262. Urbaniak, A., Molski, M. & Szelag, M. Quantum-chemical Calculations of the Antioxidant Properties of trans-p-coumaric Acid and trans-sinapinic Acid. *Comput. Methods Sci. Technol.* **18**, 117–128 (2012).
263. Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesì, C. & Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 577–586 (2005).
264. Washabau, R. . & Day, M. . Liver. in *Canine and Feline Gastroenterology* (eds. Washabau, R. . & Day, M. .) 849–957 (W.B. Saunders, 2013). doi:10.1016/B978-1-4160-3661-6.00061-4
265. Ramaiah, S. K. & Banerjee, A. Liver Toxicity of Chemical Warfare Agents. *Handb. Toxicol. Chem. Warf. Agents* 549–560 (2009). doi:10.1016/B978-012374484-5.00037-7
266. Vekemans, K. & Braet, F. Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 5095–102 (2005).
267. Ross, M. H. & Pawlina, W. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011).
268. Eroschenko, V. P. & Fiore, M. S. H. di. *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
269. Campbell, I. Liver: metabolic functions. *Anaesth. Intensive Care Med.* **7**, 51–54 (2006).
270. Čukuranović, R. *Anatomija čoveka: Abdomen*. (Knjižara Sveti Sava, 2002).
271. Anđelković, Z. et al. *Histološka građa organa*. (Bonafides, 2001).
272. Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. *Color textbook of histology*. (Saunders/Elsevier, 2007).
273. Barrett, K. E. & Ganong, W. F. *Ganong's review of medical physiology*. (McGraw-Hill Medical, 2012).
274. Alpern, R. J., Caplan, M. J. & Moe, O. W. *Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology & Pathophysiology*. (Elsevier Science, 2013).
275. Mescher, A. & Junqueira, L. . *Junqueira's basic histology: text and atlas*. (McGraw-Hill Companies, 2013).
276. Srdić-Galić, B. *Anatomija čoveka: karlica: za studente medicine*. (Medicinski fakultet Novi Sad, 2015).
277. Stojić, V. *Veterinarska fiziologija*. (Naučna KMD, 2007).
278. Srdić-Galić, B., Babović, S., Obradović, D. *Anatomija čoveka: karlica: za studente medicine*. (Medicinski fakultet Novi Sad, 2015).
279. Hinson, J. et al. Hormonal control of reproduction part i: male reproductive system. *Endocr. Syst.* 87–98 (2010). doi:10.1016/B978-0-7020-3372-8.00008-2
280. Sanderson, J. T. The Steroid Hormone Biosynthesis Pathway as a Target for Endocrine-Disrupting Chemicals. *Toxicol. Sci.* **94**, 3–21 (2006).
281. Ayaz, O. & Howlett, S. E. Testosterone modulates cardiac contraction and calcium

- homeostasis: cellular and molecular mechanisms. *Biol. Sex Differ.* **6**, 9 (2015).
282. Barnham, K. J. & Bush, A. I. Biological metals and metal-targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 6727–6749 (2014).
283. Ndagi, U., Mhlongo, N. & Soliman, M. E. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug Des. Devel. Ther.* **11**, 599–616 (2017).
284. Muhammad, N. & Guo, Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 144–153 (2014).
285. Kostova, I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **1**, 1–22 (2006).
286. Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A. & Lippard, S. J. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* **377**, 649–652 (1995).
287. Dugbartey, G. J., Peppone, L. J. & de Graaf, I. A. M. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology* **371**, 58–66 (2016).
288. Rybak, L. P., Mukherjee, D., Jajoo, S. & Ramkumar, V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J. Exp. Med.* **219**, 177–86 (2009).
289. Kim, J., Pramanick, S., Lee, D., Park, H. & Kim, W. J. Polymeric biomaterials for the delivery of platinum-based anticancer drugs. *Biomater. Sci.* **3**, 1002–1017 (2015).
290. Shahid, F., Farooqui, Z. & Khan, F. Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. *Eur. J. Pharmacol.* **827**, 49–57 (2018).
291. Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N. & Nugent, K. Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *Am. J. Med. Sci.* **334**, 115–124 (2007).
292. Miller, R. P., Tadagavadi, R. K., Ramesh, G. & Reeves, W. B. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. **2**, 2490–518 (2010).
293. Ciftci, O., Beytur, A., Cakir, O., Gurbuz, N. & Vardi, N. Comparison of reproductive toxicity caused by cisplatin and novel platinum-n-heterocyclic carbene complex in male rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **109**, 328–333 (2011).
294. Jaeschke, H. *et al.* Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* **65**, 166–76 (2002).
295. Radosavljević, T., Mladenović, D., Vucević, D. & Vukićević, R. J. The role of oxidative/nitrosative stress in pathogenesis of paracetamol-induced toxic hepatitis. *Med. Pregl.* **63**, 827–32 (2010).
296. Wu, H. & Huang, J. Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies. *Curr. Drug Metab.* **19**, 559–567 (2018).
297. Vargesson, N. Thalidomide. *Reprod. Dev. Toxicol.* 467–479 (2017). doi:10.1016/B978-0-12-804239-7.00026-3
298. Mantovani, A. Endocrine disruptors: A Review. *Encycl. Food Chem.* 481–486 (2019). doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.21810-6
299. Soliman, A. M., Desouky, S., Marzouk, M. & Sayed, A. A. *Origanum majorana* attenuates nephrotoxicity of cisplatin anticancer drug through ameliorating oxidative stress. *Nutrients* **8**, (2016).
300. Mejri, H. *et al.* Does *Eryngium maritimum* seeds extract protect against CCl₄ and cisplatin induced toxicity in rats: Preliminary phytochemical screening and assessment of its in vitro and in vivo antioxidant activity and antifibrotic effect. *J. Funct. Foods* **37**,

- 363–372 (2017).
301. Navarro, V. J. *et al.* Liver injury from herbal and dietary supplements. *Hepatology* **65**, 363–373 (2017).
302. García-Cortés, M., Robles-Díaz, M., Ortega-Alonso, A., Medina-Caliz, I. & Andrade, R. J. Hepatotoxicity by Dietary Supplements: A Tabular Listing and Clinical Characteristics. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 537 (2016).
303. Hussain, T. *et al.* Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–9 (2016).
304. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. & Malik, A. B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1126–67 (2014).
305. Biswas, S. K. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–9 (2016).
306. Schroder, K. & Tschopp, J. The Inflammasomes. *Cell* **140**, 821–832 (2010).
307. Khanapure, S., Garvey, D., Janero, D. & Gordon Letts, L. Eicosanoids in Inflammation: Biosynthesis, Pharmacology, and Therapeutic Frontiers. *Curr. Top. Med. Chem.* **7**, 311–340 (2007).
308. Hanna, V. S. & Hafez, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *J. Adv. Res.* **11**, 23–32 (2018).
309. Furse, K. E. *et al.* Molecular dynamics simulations of arachidonic acid-derived pentadienyl radical intermediate complexes with COX-1 and COX-2: insights into oxygenation regio- and stereoselectivity. *Biochemistry* **45**, 3206–18 (2006).
310. Zarghi, A. & Arfaei, S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **10**, 655–83 (2011).
311. Simmons, D. L. Variants of cyclooxygenase-1 and their roles in medicine. *Thromb. Res.* **110**, 265–8 (2003).
312. Kam, P. C. A. & So, A. COX-3: Uncertainties and controversies. *Curr. Anaesth. Crit. Care* **20**, 50–53 (2009).
313. Kuhn, H., Banthiya, S. & van Leyen, K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 308–330 (2015).
314. Chandrasekharan, J. A. & Sharma-Walia, N. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. *J. Inflamm. Res.* **8**, 181–92 (2015).
315. Harirforoosh, S., Asghar, W. & Jamali, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **16**, 821–47 (2013).
316. Kvržić, J. Herbal drugs of the local origin with analgesic activity. *Lek. sirovine* 61–74 doi:10.5937/LEKSIR1535061K
317. Ghasemian, M., Owlia, S. & Owlia, M. B. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2016**, 1–11 (2016).
318. Srivastava, J. K., Pandey, M. & Gupta, S. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sci.* **85**, 663–669 (2009).
319. Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K., Tago, K., Mashino, T. & Kasahara, T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1150–1159 (2011).
320. Lesjak, M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J. Funct. Foods* **40**, 68–75 (2018).

321. Chen, S., Jiang, H., Wu, X. & Fang, J. Therapeutic Effects of Quercetin on Inflammation, Obesity, and Type 2 Diabetes. *Mediators Inflamm.* **2016**, 9340637 (2016).
322. Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I. & Wang, W. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacol. Res.* **139**, 126–140 (2019).
323. Zhang, L., Virgous, C. & Si, H. Synergistic anti-inflammatory effects and mechanisms of combined phytochemicals. *J. Nutr. Biochem.* (2019). doi:10.1016/J.JNUTBIO.2019.03.009
324. Singleton, V. L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **299**, 152–178 (1998).
325. Quettier-Deleu, C. *et al.* Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.* **72**, 35–42 (2000).
326. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care(EDQM). *European Pharmacopoeia*. (Council of Europe, 2011).
327. Guiwen W. Cheng and Patrick J. Breen. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (pal) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **116**, 865–869 (1991).
328. Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Grootaert, C. & Van Camp, J. Anthocyanin Absorption and Metabolism by Human Intestinal Caco-2 Cells--A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 21555–74 (2015).
329. Scalbert, A., Monties, B. & Janin, G. Tannin in wood: Comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1324–1329 (1989).
330. Arbenz, A. & Avérous, L. Chemical modification of tannins to elaborate aromatic biobased macromolecular architectures. *Green Chemistry* **17**, 2626–2646 (2015).
331. Haslam, E. Galloyl esters in the Aceraceae. *Phytochemistry* **4**, 495–498 (1965).
332. Kumarasamy, Y. *et al.* Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phyther. Res.* **21**, 615–621 (2007).
333. Re, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237 (1999).
334. Chung, S.-K., Osawa, T. & Kawakishi, S. Hydroxyl Radical-scavenging Effects of Spices and Scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*) . *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (1997). doi:10.1271/bbb.61.118
335. Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. Spectrophotometric Quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* **269**, 337–341 (1999).
336. Oyaizu, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* **44**, 307–315 (1986).
337. Chew, Y. L., Goh, J. K. & Lim, Y. Y. Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chem.* **116**, 13–18 (2009).
338. Kikuzaki, H. & Nakatani, N. Antioxidant Effects of Some Ginger Constituents. *J. Food Sci.* (1993). doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb06194.x

339. NCCLS. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing 174 of Filamentous Fungi; Approved Standard*. CLSI document M38-A. (NCCLS, 2002).
340. NCCLS. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing 170 of Yeasts; Approved Standard – Second Edition*. CLSI document M27-A2. (NCCLS, 2002).
341. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI Document M07-A9. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).
342. Sarker, S. D., Nahar, L. & Kumarasamy, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* **42**, 321–324 (2007).
343. Fiebich, B. L. *et al.* Petasites hybridus extracts in vitro inhibit COX-2 and PGE2 release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44 MAP kinase activation in rat primary microglial cells. *Planta Med.* **71**, 12–19 (2005).
344. Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2**, 17023 (2017).
345. Pacifico, S. *et al.* Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Food Res. Int.* (2015). doi:10.1016/j.foodres.2014.12.019
346. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
347. Wiegand, C. & Hipler, U.-C. Evaluation of Biocompatibility and Cytotoxicity Using Keratinocyte and Fibroblast Cultures. *Skin Pharmacol. Physiol.* **22**, 74–82 (2009).
348. Pascua-Maestro, R. *et al.* The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. *Acta Histochem.* **120**, 179–186 (2018).
349. Del Giudice, R. *et al.* Antioxidant bioactive compounds in tomato fruits at different ripening stages and their effects on normal and cancer cells. *J. Funct. Foods* **18**, 83–94 (2015).
350. Rigano, M. M. *et al.* Quantitative Trait Loci Pyramiding Can Improve the Nutritional Potential of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 11519–11527 (2014).
351. Ngashangva, L., Bachu, V. & Goswami, P. Development of new methods for determination of bilirubin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **162**, 272–285 (2019).
352. Kumar, V., Gill, K. D., Kumar, V. & Gill, K. D. To Estimate Total and Direct Bilirubin in Serum. in *Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide* 97–101 (Springer Singapore, 2018). doi:10.1007/978-981-10-8186-6_24
353. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–75 (1951).
354. Beers, R. F. & Sizer, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**, 133–40 (1952).
355. Misra, H. P. & Fridovich, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **247**, 3170–5 (1972).
356. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–7 (1959).

357. Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351–358 (1979).
358. El-Hadidy, E. M. *et al.* Effect of Lion's Foot (*Alchemilla vulgaris*) on liver and renal functions in rats induced by CCl₄. *Food Nutr. Sci.* **09**, 46–62 (2018).
359. Dimiņš, F., Miķelsons, V. & Kaņeps, M. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B, Natural, exact, and applied sciences.* (2013).
360. Sarina M. Duckstein *et al.* Phenolic constituents from *Alchemilla vulgaris* L. and *Alchemilla mollis* (Buser) Rothm. at different dates of harvest. *Z. Naturforsch* **67c**, 529–540 (2012).
361. Tasić-Kostov, M. *et al.* Towards a modern approach to traditional use: in vitro and in vivo evaluation of *Alchemilla vulgaris* L. gel wound healing potential. *J. Ethnopharmacol.* **238**, 111789 (2019).
362. Oszmianski, J., Wojdylo, A., Lamer-Zarawska, E. & Swiader, K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chem.* **100**, 579–583 (2007).
363. Choudhary, A., Radhika, M., Chatterjee, A., Banerjee, U. C. & Singh, I. P. Qualitative and Quantitative Analysis of *Potentilla fulgens* Roots by NMR, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation with Time-of-Flight MS, Electrospray Ionisation MS/MS and HPLC/UV. *Phytochem. Anal.* **26**, 161–170 (2015).
364. Shanaida, M., Golembiovskaja, O., Hudz, N. & Wieczorek, P. Phenolic compounds of herbal infusions obtained from some species of the Lamiaceae family. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* **31**, 194–199 (2018).
365. Koşar, M., Dorman, H. J. D. & Hiltunen, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem.* **91**, 525–533 (2005).
366. Janicsák, G., Máthé, I., Miklóssy-Vári, V. & Blunden, G. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochem. Syst. Ecol.* **27**, 733–738 (1999).
367. Kedare, S. B. & Singh, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* (2011). doi:10.1007/s13197-011-0251-1
368. Lü, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q. & Chen, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 840–860 (2010).
369. Lipinski, B. Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2011). doi:10.1155/2011/809696
370. Yin, H., Xu, L. & Porter, N. A. Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chem. Rev.* **111**, 5944–5972 (2011).
371. Husna, K. *et al.* *Alchemilla vulgaris* and *Filipendula ulmaria* extracts as potential natural preservatives in beef patties. *Malaysian J. Anal. Sci.* **21**, 986–995 (2017).
372. Dorman, H. J. . & Hiltunen, R. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chem.* **88**, 193–199 (2004).
373. Kamkar, A. *et al.* Antioxidant Activity of Methanol and Ethanol Extracts of *Satureja hortensis* L. in Soybean Oil. *J. Food Qual. Hazards Control* **1**, 113–119 (2014).
374. Kalantzakis, G. & Blekas, G. Effect of Greek sage and summer savory extracts on vegetable oil thermal stability. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **108**, 842–847 (2006).

375. Kilic, I., Yeşiloğlu, Y. & Bayrak, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **130**, 447–452 (2014).
376. Chen, Y., Xiao, H., Zheng, J. & Liang, G. Structure-thermodynamics-antioxidant activity relationships of selected natural phenolic acids and derivatives: An experimental and theoretical evaluation. *PLoS One* **10**, (2015).
377. Brewer, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **10**, 221–247 (2011).
378. Cavia-Saiz, M. *et al.* Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J. Sci. Food Agric.* **90**, 1238–1244 (2010).
379. Silva, M. M. *et al.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radic. Res.* **36**, 1219–1227 (2002).
380. Kuete, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. *Planta Med.* **76**, 1479–1491 (2010).
381. Keskin, D., Oskay, D. & Oskay, M. Antimicrobial activity of selected plant spices marketed in the West Anatolia. *Int. J. Agric. Biol.* **12**, 916–920 (2010).
382. Canli, K., Yetgin, A. & Murat Altuner, E. *Antimicrobial screening of Alchemilla vulgaris herbs and flowers. International Journal of Pharmaceutical Science Invention* ISSN **6**, (Online, 2017).
383. Djipa, C. D., Delmée, M. & Quetin-Leclercq, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* **71**, 307–313 (2000).
384. Górniak, I., Bartoszewski, R. & Króliczewski, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem. Rev.* **18**, 241–272 (2019).
385. Kotan, R. *et al.* Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **153**, 34–41 (2013).
386. Katanić, J. *et al.* Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of *Filipendula vulgaris* Moench extracts. *Food Chem. Toxicol.* **122**, 151–162 (2018).
387. Vecchio, A. J. & Malkowski, M. G. The structure of NS-398 bound to cyclooxygenase-2. *J. Struct. Biol.* **176**, 254–258 (2011).
388. Kang, S. R. *et al.* Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea *Citrus aurantium* L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF-κB) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. *Food Chem.* **129**, 1721–1728 (2011).
389. Noailles, A., Maneu, V., Campello, L., Lax, P. & Cuenca, N. Systemic inflammation induced by lipopolysaccharide aggravates inherited retinal dystrophy. *Cell Death Dis.* **9**, 350 (2018).
390. Hajhashemi, V., Ghannadi, A. & Pezeshkian, S. K. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Satureja hortensis* L. extracts and essential oil. *J. Ethnopharmacol.* **82**, 83–87 (2002).
391. Jin, B.-R. *et al.* Rosmarinic acid suppresses colonic inflammation in dextran sulphate sodium (DSS)-induced mice via dual inhibition of NF-κB and STAT3 activation. *Sci. Rep.* **7**, 46252 (2017).
392. Jiang, K. *et al.* Anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Inflammation* **41**, 437–448 (2018).

393. Szymanowska, U., Baraniak, B. & Bogucka-Kocka, A. Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Postulated Cytotoxic Activity of Phenolic and Anthocyanin-Rich Fractions from Polana Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Fruit and Juice-In Vitro Study. *Molecules* **23**, (2018).
394. Karlsson, S., Nnberg, E., Fjaeraa, C. & Wijkander, J. Ellagic acid inhibits lipopolysaccharide-induced expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandin E2 in human monocytes. *Br. J. Nutr.* **103**, 1102–1109 (2010).
395. Yun, K. J. *et al.* Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor- κ B inactivation. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10265–10272 (2008).
396. Kang, N. J., Shin, S. H., Lee, H. J. & Lee, K. W. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* **130**, 310–324 (2011).
397. Sadar, S. S., Vyawahare, N. S. & Bodhankar, S. L. Ferulic acid ameliorates tnbs-induced ulcerative colitis through modulation of cytokines, oxidative stress, inos, cox-2, and apoptosis in laboratory rats. *EXCLI J.* **15**, 482–499 (2016).
398. Ghorbanzadeh, B. *et al.* A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. *Indian J. Pharmacol.* **47**, 292 (2015).
399. Ribeiro, D. *et al.* Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Cytokine/Chemokine Production in Human Whole Blood. *Inflammation* **38**, 858–870 (2015).
400. Keong, L. C. & Halim, A. S. In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical-Grade Chitosan Derivatives in Wound Management. *Int. J. Mol. Sci.* **10**, 1300 (2009).
401. Wojtowicz, A. M. *et al.* The importance of both fibroblasts and keratinocytes in a bilayered living cellular construct used in wound healing. *Wound Repair Regen.* **22**, 246–255 (2014).
402. Bruggisser, R., Daeniken, K. von, Jundt, G., Schaffner, W. & Tullberg-Reinert, H. Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. *Planta Med.* **68**, 445–448 (2002).
403. Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F. & Rafiee, R. In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja sahendica*. *Toxicol. Environ. Chem.* **94**, 1735–1745 (2012).
404. Cetojević-Simin, D. D. *et al.* Antioxidative and antiproliferative effects of *Satureja montana* L. extracts. *J. BUON.* **9**, 443–9
405. Xavier, C. P. R., Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C. *Salvia fruticosa*, *salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: The role in MAPK/ERK pathway. *Nutr. Cancer* **61**, 564–571 (2009).
406. Moore, J., Yousef, M. & Tsiani, E. Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients* **8**, (2016).
407. Ceci, C. *et al.* Experimental evidence of the antitumor, antimetastatic and antiangiogenic activity of ellagic acid. *Nutrients* **10**, (2018).
408. Marullo, R. *et al.* Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions.

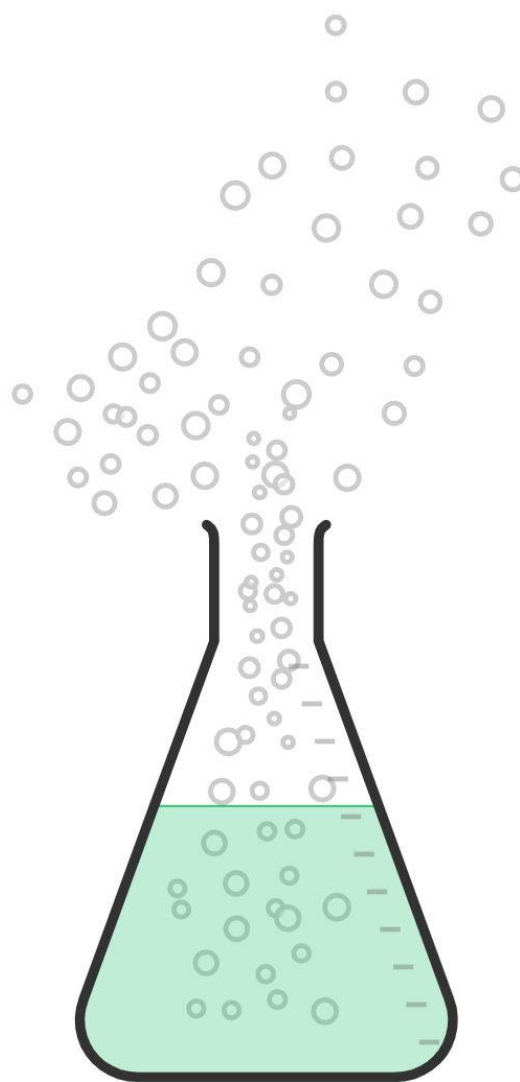
- PLoS One* **8**, e81162 (2013).
409. Chirino, Y. I. & Pedraza-Chaverri, J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.* **61**, 223–242 (2009).
410. Giannini, E. G., Testa, R. & Savarino, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* **172**, 367–79 (2005).
411. Botros, M. & Sikaris, K. A. The de ritis ratio: The test of time. *Clin. Biochem. Rev.* **34**, 117–130 (2013).
412. Hall, P. & Cash, J. What is the real function of the Liver ‘Function’ tests? *Ulster Med. J.* **81**, 30–36 (2012).
413. Tanaka, A., Suemaru, K. & Araki, H. A New Approach for Evaluating Renal Function and Its Practical Application. *J. Pharmacol. Sci.* **105**, 1–5 (2007).
414. Giordano, C., Karasik, O., King-Morris, K. & Asmar, A. Uric Acid as a Marker of Kidney Disease: Review of the Current Literature. *Dis. Markers* **2015**, 382918 (2015).
415. Yaman, T. *et al.* Protective effects of silymarin on methotrexate-induced damages in rat testes. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **54**, (2018).
416. Ghosh, S., Sarkar, A., Bhattacharyya, S. & Sil, P. C. Silymarin protects mouse liver and kidney from thioacetamide induced toxicity by scavenging reactive oxygen species and activating PI3K-Akt pathway. *Front. Pharmacol.* **7**, 481 (2016).
417. Ince, S. *et al.* Protective effect of polydatin, a natural precursor of resveratrol, against cisplatin-induced toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* **72**, 147–153 (2014).
418. McGill, M. R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J.* **15**, 817–828 (2016).
419. Robles-Diaz, M. *et al.* The value of serum aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase as biomarkers in hepatotoxicity. *Liver Int.* **35**, 2474–2482 (2015).
420. Ozbek, H. *et al.* Evaluation of hepatoprotective and antidiabetic activity of *Alchemilla mollis*. *Biomed. Pharmacother.* **86**, 172–176 (2017).
421. Perez Gutierrez, R. & Gallardo Navarro, Y. Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacogn. Mag.* **6**, 125 (2010).
422. Ramadan, L. A., Roushdy, H. M., Abu Senna, G. M., Amin, N. E. & El-Deshw, O. A. Radioprotective effect of silymarin against radiation induced hepatotoxicity. *Pharmacol. Res.* **45**, 447–454 (2002).
423. Domitrović, R. *et al.* Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 370–378 (2013).
424. Elufioye, T. O. & Habtemariam, S. Hepatoprotective effects of rosmarinic acid: Insight into its mechanisms of action. *Biomed. Pharmacother.* **112**, 108600 (2019).
425. Akanitapichat, P., Phraibung, K., Nuchklang, K. & Prompitakkul, S. Antioxidant and hepatoprotective activities of five eggplant varieties. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 3017–3021 (2010).
426. Yoshikawa, M., Ninomiya, K., Shimoda, H., Nishida, N. & Matsuda, H. Hepatoprotective and Antioxidative Properties of *Salacia reticulata*: Preventive Effects of Phenolic Constituents on CCl₄-Induced Liver Injury in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 72–76 (2002).
427. Chtourou, Y., Aouey, B., Aroui, S., Kebieche, M. & Fetoui, H. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. *Chem. Biol.*

- Interact.* **243**, 1–9 (2016).
428. Domitrović, R., Potočnjak, I., Crnčević-Orlić, Ž. & Škoda, M. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Food Chem. Toxicol.* **66**, 321–328 (2014).
429. El-Garhy, A. M., Abd El-Raouf, O. M., El-Sayeh, B. M., Fawzy, H. M. & Abdallah, D. M. Ellagic acid antiinflammatory and antiapoptotic potential mediate renoprotection in cisplatin nephrotoxic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **28**, 472–479 (2014).
430. Mori Sequeiros García, M. *et al.* Cisplatin inhibits testosterone synthesis by a mechanism that includes the action of reactive oxygen species (ROS) at the level of P450scc. *Chem. Biol. Interact.* **199**, 185–191 (2012).
431. Zavatti, M. *et al.* Experimental study on *Satureja montana* as a treatment for premature ejaculation. *J. Ethnopharmacol.* **133**, 629–633 (2011).
432. Haeri, S. *et al.* Effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on male rat fertility. *Fitoterapia* **77**, 495–499 (2006).
433. Sansalone, S. *et al.* A combination of tryptophan, *Satureja montana*, *Tribulus terrestris*, *Phyllanthus emblica* extracts is able to improve sexual quality of life in patient with premature ejaculation. *Arch. Ital. di Urol. e Androl.* **88**, 171 (2016).
434. Baraldi, M. The use of winter savory (*satureja montana*) or the extracts thereof for the preparation of medicaments for the treatment of the premature ejaculation. (2005).
435. Ho, E., Karimi Galougahi, K., Liu, C.-C., Bhindi, R. & Figtree, G. A. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* **1**, 483–91 (2013).
436. Oun, R., Moussa, Y. E. & Wheate, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton Transactions* (2018). doi:10.1039/c8dt00838h
437. Nematbakhsh, M. *et al.* A histopathological study of nephrotoxicity, hepatotoxicity or testicular toxicity: Which one is the first observation as side effect of Cisplatin-induced toxicity in animal model? *J. Nephropathol.* **1**, 190–193 (2012).
438. Ekinçi Akdemir, F. N., Albayrak, M., Çalik, M., Bayir, Y. & Gülçin, İ. The Protective Effects of p-Coumaric Acid on Acute Liver and Kidney Damages Induced by Cisplatin. *Biomedicines* **5**, (2017).
439. Aksu, E. H. *et al.* Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats. *Andrologia* **49**, e12593 (2017).
440. Liu, H. & Baliga, R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. *Kidney Int.* **63**, 1687–1696 (2003).
441. Badary, O. A., Abdel-Maksoud, S., Ahmed, W. A. & Owieda, G. H. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* **76**, 2125–2135 (2005).
442. Rana, M. A., Khan, R., Nasiruddin, M. & Khan, A. Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by ethanolic extract of *Bauhinia purpurea*: An in vivo study in rats. *Saudi J. Kidney Dis. Transplant.* **27**, 41 (2016).
443. Manohar, S. & Leung, N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J. Nephrol.* **31**, 15–25 (2018).
444. Ma, S.-F. *et al.* Combining cisplatin with cationized catalase decreases nephrotoxicity while improving antitumor activity. *Kidney Int.* **72**, 1474–1482 (2007).

445. Davis, C. A., Nick, H. S. & Agarwal, A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2683–90 (2001).
446. Wainford, R. D., Weaver, R. J., Stewart, K. N., Brown, P. & Hawksworth, G. M. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology* **249**, 184–193 (2008).
447. Karwasra, R. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory potential of pomegranate rind extract to ameliorate cisplatin-induced acute kidney injury. *Food Funct.* (2016). doi:10.1039/c6fo00188b
448. Beytur, A., Ciftci, O., Oguz, F., Oguzturk, H. & Yılmaz, F. Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **69**, 207–213 (2012).
449. Fatima, S. *et al.* Combined treatment of epigallocatechin gallate and Coenzyme Q10 attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity via suppression of oxidative/nitrosative stress, inflammation and cellular damage. *Food Chem. Toxicol.* **94**, 213–220 (2016).
450. Malik, S. *et al.* Molecular mechanisms underlying attenuation of cisplatin-induced acute kidney injury by epicatechin gallate. *Lab. Invest.* **96**, 853–61 (2016).
451. Wilmes, A. *et al.* Mechanism of cisplatin proximal tubule toxicity revealed by integrating transcriptomics, proteomics, metabolomics and biokinetics. *Toxicol. Vitro.* **30**, 117–127 (2015).
452. Sherif, I. O., Abdel-Aziz, A. & Sarhan, O. M. Cisplatin-induced testicular toxicity in rats: the protective effect of arjunolic acid. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **28**, 515–21 (2014).
453. Kaya, K., Ciftci, O., Cetin, A., Doğan, H. & Başak, N. Hesperidin protects testicular and spermatological damages induced by cisplatin in rats. *Andrologia* **47**, 793–800 (2015).
454. Türk, G., Çeribaşı, A. O., Şahna, E. & Ateşşahin, A. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. *Phytomedicine* **18**, 356–361 (2011).
455. Mercantepe, F., Mercantepe, T., Topcu, A., Yılmaz, A. & Tumkaya, L. Protective effects of amifostine, curcumin, and melatonin against cisplatin-induced acute kidney injury. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **391**, 915–931 (2018).
456. Ognjanović, B. I. *et al.* Lipid peroxidative damage on cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: A possible protective effect of selenium. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 1790–1803 (2012).
457. Zhang, Q.-Y., Wang, F.-X., Jia, K.-K. & Kong, L.-D. Natural Product Interventions for Chemotherapy and Radiotherapy-Induced Side Effects. *Front. Pharmacol.* **9**, 1253 (2018).
458. Pezzani, R. *et al.* Synergistic Effects of Plant Derivatives and Conventional Chemotherapeutic Agents: An Update on the Cancer Perspective. *Medicina (Kaunas)*. **55**, (2019).
459. Ojha, S. *et al.* Plant-Derived Agents for Counteracting Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–27 (2016).
460. Al-Kharusi, N. *et al.* Ellagic acid protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: a dose-dependent study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **17**, 299–310 (2013).
461. Yüce, A., Ateşşahin, A., Çeribaşı, A. O. & Aksakal, M. Ellagic Acid Prevents Cisplatin-Induced Oxidative Stress in Liver and Heart Tissue of Rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **101**, 345–349 (2007).
462. Tian, J. & Jiang, W. Rosmarinic acid inhibits acute renal injury and cyst formation in

- cisplatin-treated rat kidney. *Toxicol. Lett.* **164**, S265 (2006).
463. Breitzig, M., Bhimineni, C., Lockey, R. & Kolliputi, N. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **311**, C537–C543 (2016).
464. Jahan, S. *et al.* Ameliorative effects of rutin against cisplatin-induced reproductive toxicity in male rats. *BMC Urol.* **18**, 107 (2018).
465. Aldemir, M. *et al.* Evaluation of the protective effect of quercetin against cisplatin-induced renal and testis tissue damage and sperm parameters in rats. *Andrologia* **46**, 1089–1097 (2014).
466. Waseem, M., Tabassum, H., Bhardwaj, M. & Parvez, S. Ameliorative efficacy of quercetin against cisplatin-induced mitochondrial dysfunction: Study on isolated rat liver mitochondria. *Mol. Med. Rep.* **16**, 2939–2945 (2017).
467. Ochiai, T. *et al.* Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingomyelinase-ceramide signaling by increasing glutathione synthesis. *Neurochem. Int.* **44**, 321–30 (2004).
468. Rehman, M. U. *et al.* Alleviation of hepatic injury by chrysin in cisplatin administered rats: Probable role of oxidative and inflammatory markers. *Pharmacol. Reports* **66**, 1050–1059 (2014).

Биографија са библиографијом





Татјана М. Јурић (рођ. Бороја) рођена је 4.12.1989. године у Новом Саду. Гимназију „20. октобар“ у Бачкој Паланци завршила је као носилац Вукове дипломе. Године 2008. уписује основне академске студије Биохемије на Природно-математичком факултету у Новом Саду, које завршава за 3 године и 10 месеци са просечном оценом 9,21. На истом факултету школске 2012/2013. године уписује мастер студије Биохемије, које завршава 2013. године са просечном оценом 10,00, након чега 2013. године постаје студент докторских академских студија Хемије, модул Биохемија, на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Све испите предвиђене планом и програмом докторских студија положила је са просечном оценом 10,00. У периоду од 2014-2018. године била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја, која је додељује успешним докторандима. Запослена је на Пољопривредном факултету у Новом Саду као истраживач сарадник са пуним радним временом на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја TR31029 „Функционални производи на бази жита намењени особама са метаболичким поремећајима“.

У току основних и мастер студија била је вишеструко награђивана од стране Природно-математичког факултета у Новом Саду за постигнут успех и континуитет у студирању. Током студирања је била стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја. Добитник је Специјалног признања Српског хемијског друштва намењеног најбољим дипломираним студентима хемије у Србији. Полазник је Истраживачке станице Петница (2006. године), учесник Летње школе лековитог биља (ПМФ Нови Сад, 2009. године) и радионице о молекулском дизајну лекова (ПМФ Крагујевац и Rome Center for Molecular Design, 2014. године). Током мастер студија, школске 2013/2014. године била је практикант у Универзитетском центру за развој каријере и саветовање студената, где је била задужена за организовање радионица лаких каријерних вештина.

Говори енглески и руски језик, познаје основе немачког језика и активно се служи рачунаром. Поседује међународно признати Кембрицов сертификат о познавању енглеског језика на нивоу Б2 (Cambridge First Certificate in English) и DAAD сертификат о познавању немачког језика (А1 ниво). Као финалиста Светског фестивала руског језика у категорији студената (у организацији Међународне асоцијације предавача руског језика (МАПРЯЛ)), боравила је недељу дана у Санкт Петербургу (Русија) 2011. године.

Татјана М. Јурић се активно бави научноистраживачким радом на пољу испитивања фитохемијског профила и биолошких активности лековитог биља и других извора биоактивних једињења. О научном доприносу ове докторске дисертације сведоче 3 рада публикована у часописима са SCI листе: један рад у категорији међународног часописа изузетних вредности (M21a) и два рада у истакнутом међународном часопису (M22), осам саопштења на скуповима међународног значаја и једно саопштење у целини на скупу националног значаја. Преглед публикованих радова проистеклих из ове докторске дисертације представљен је у Прилогу. Целокупан приказ библиографских јединица аутора дат је у наставку, а симболом * су означене публикације проистекле радом на овој докторској дисертацији.

Списак публикација у међународним научним часописима

1. ***Tatjana Jurić**, Jelena S. Katanić Stanković, Gvozden Rosić, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Vesna Stanković, Danijela Mišić, Vladimir Mihailović, Protective effects of *Alchemilla vulgaris* L. extracts against cisplatin-induced toxicological alterations in rats, *South African Journal of Botany*, 2020, Vol. 128, p. 141-151.
M22,
IF₂₀₁₈ = 1,504
2. ***Tatjana Boroja**, Jelena Katanić, Gvozden Rosić, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Danijela Mišić, Vesna Stanković, Nemanja Jovičić, Vladimir Mihailović, Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, Vol. 118, p. 252-263.
M21a,
IF₂₀₁₇ = 3,977
3. ***Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, San-Po Pan, Stefanie Nikles, Paola Imbimbo, Daria Maria Monti, Nevena Stanković, Milan S. Stanković, Rudolf Bauer, The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 2018, Vol. 116, p. 175-184.
M22,
IF₂₀₁₈ = 1,504
4. Igor Kumburović, Dragica Selaković, **Tatjana Jurić**, Nemanja Jovičić, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić Stanković, Nikola Srećković, Davor Kumburović, Vladimir Jakovljević, Gvozden Rosić, Antioxidant effects of *Satureja hortensis* L. attenuate the anxiogenic effect of cisplatin in rats, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019, 15 pages, 2019.
M21a,
IF₂₀₁₈: 4,868
5. Jelena S. Katanić Stanković, Ramazan Ceylan, Gokhan Zengin, Sanja Matić, **Tatjana Jurić**, Alina Diuzheva, Jozsef Jeko, Zoltan Cziaky, Abdurrahman Aktumsek, Multiple biological activities of two *Onosma* species (*O. sericea* and *O. stenolaba*) and HPLC-

MS/MS characterization of their phytochemical composition, *Industrial Crops and Products*, 2020, Accepted Manuscript.

M21a,

IF₂₀₁₈: 3,220

6. Vladimir Mihailović, Jelena S. Katanić Stanković, **Tatjana Jurić**, Nikola Srećković, Danijela Mišić, Branislav Šiler, Daria Maria Monti, Paola Imbimbo, Stefanie Nikles, San Po-Pan, Rudolf Bauer, *Blackstonia perfoliata* (L.) Huds. (Gentianaceae): A promising source of useful bioactive compounds, *Industrial Crops and Products*, 2019, 111974.

M21a,

IF₂₀₁₈: 3,220

7. Jelena Katanić, Fatima Yousfi Marisa, Carmela Caruso, Sanja Matić, Daria Maria Monti, El Hassania Loukili, **Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Fernanda Galgano, Paola Imbimbo, Ganna Petruk, Mohamed Bouhrim, Mohamed Bnouham, Mohammed Ramdani, Characterization of bioactivity and phytochemical composition with toxicity studies of different *Opuntia dillenii* extracts from Morocco, *Food Bioscience*, 2019, Vol. 30, p. 100410.

M21,

IF₂₀₁₈: 3,220

8. Jelena Katanić, Eva-Maria Pferschy-Wenzig, Vladimir Mihailović, **Tatjana Boroja**, San-Po Pan, Stefanie Nikles, Nadine Kretschmer, Gvozden Rosić, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Rudolf Bauer, Phytochemical analysis and anti-inflammatory effects of *Filipendula vulgaris* Moench extracts. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, Vol. 122, p. 151-162.

M21a,

IF₂₀₁₈: 3,977

9. Gokhan Zengin, Ramazan Ceylan, Jelena Katanić, Abdurrahman Aktumsek, Sanja Matić, **Tatjana Boroja**, Snežana Stanić, Vladimir Mihailović, Roumita Seebaluck-Sandoram, Adriano Mollica, Mohamad Fawzi Mahomoodally, Exploring the therapeutic potential and phenolic composition of two Turkish ethnomedicinal plants – *Ajuga orientalis* L. and *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb, *Industrial Crops and Products*, Volume 116, 2018, 240-248.

M21,

IF₂₀₁₈: 3,220

10. Gokhan Zengin, Ramazan Ceylan, Jelena Katanić, Adriano Mollica, Abdurrahman Aktumsek, **Tatjana Boroja**, Sanja Matić, Vladimir Mihailović, Snežana Stanić, Zaahira Aumeeruddy-Elalfi, Mustafa Abdullah Yilmaz, Mohamad Fawzi Mahomoodally, Combining *in vitro*, *in vivo* and *in silico* approaches to evaluate nutraceutical potentials and chemical fingerprints of *Moltkia aurea* and *Moltkia coerulea*, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 107, 2017, 540-553.

M21a,

IF₂₀₁₆: 3,778

11. Jovana Joksimović, Dragica Selaković, Vladimir Jakovljević, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Gvozden Rosić, Alterations of the oxidative status in rat hippocampus and prodepressant effect of chronic testosterone enanthate administration, *Molecular and Cellular Biochemistry*, Volume 381, 2017, 1-10.

M23,

12. Jelena Katanić, Sanja Matić, Eva-Maria Pferschy-Wenzig, Nadine Kretschmer, **Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Vesna Stanković, Nevena Stanković, Milan Mladenović, Snežana Stanić, Mirijana Mihailović, Rudolf Bauer, *Filipendula ulmaria* extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: *In vivo* investigation and LC-MS analysis, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 99, 2017, 86-102.
M21a,
IF₂₀₁₆: 3,778
13. Jelena Katanić, Ramazan Ceylan, Sanja Matić, **Tatjana Boroja**, Gokhan Zengin, Abdurrahman Aktumsek, Vladimir Mihailović, Snežana Stanić, Novel perspectives of two *Digitalis* species: Phenolic profile, bioactivity, enzyme inhibition, and toxicological evaluation, *South African Journal of Botany*, Volume 109, 2017, 50-57.
M22,
IF₂₀₁₆: 1,427
14. Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Stefanie Nikles, San-Po Pan, Gvozden Rosić, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Slobodanka Mitrović, Rudolf Bauer, *In vitro* and *in vivo* assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 193, 2016, 627-636.
M22,
IF₂₀₁₆: 2,981
15. Ramazan Ceylan, Jelena Katanić, Gokhan Zengin, Sanja Matić, Abdurrahman Aktumsek, **Tatjana Boroja**, Snežana Stanić, Vladimir Mihailović, Gokalp Ozmen Guler, Mehmet Boga, Mustafa Abdullah Yilmaz, Chemical and biological fingerprints of two Fabaceae species (*Cytisopsis dorycnifolia* and *Ebenus hirsuta*): Are they novel sources of natural agents for pharmaceutical and food formulations?, *Industrial Crops and Products*, Volume 84, 2016, 254-262.
M21,
IF₂₀₁₆: 3,181
16. Sanja Matić, Jelena Katanić, Snežana Stanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Vladimir Mihailović, **Tatjana Boroja**, *In vitro* and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 174, 2015, 287-292.
M21,
IF₂₀₁₅: 3,055
17. Vladimir Mihailović, Danijela Mišić, Sanja Matić, Mirjana Mihailović, Snežana Stanić, Miroslav M. Vrvic, Jelena Katanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković, **Tatjana Boroja**, Milan S. Stanković, Comparative phytochemical analysis of *Gentiana cruciata* L. roots and aerial parts, and their biological activities, *Industrial Crops and Products*, Volume 73, 2015, 49-62.
M21,
IF₂₀₁₅: 3,449
18. Milan Mladenović, Nevena Stanković, Sanja Matić, Snežana Stanić, Mirjana Mihailović, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Nenad Vuković, Newly discovered chroman-2,4-diones neutralize the *in vivo* DNA damage induced by alkylation through the

inhibition of Topoisomerase II α : A story behind the molecular modeling approach, *Biochemical Pharmacology*, Volume 98, 2015, 243-266.

M21a,

IF₂₀₁₅: 5,091

19. Nevena Stanković, Milan Mladenović, Sanja Matić, Snežana Stanić, Vesna Stanković, Mirjana Mihailović, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Nenad Vuković, Slobodan Sukdolak, Serum albumin binding analysis and toxicological screening of novel chroman-2,4-diones as oral anticoagulants, *Chemico-Biological Interactions*, Volume 227, 2015, 18-31.

M22,

IF₂₀₁₅: 2,618

20. Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, Sanja Matić, Vesna Stanković, Nevena Stanković, **Tatjana Boroja**, Milan Mladenović, Snežana Stanić, Samo Kreft, Mirjana Mihailović, The ameliorating effect of *Filipendula hexapetala* extracts on hepatorenal toxicity of cisplatin, *Journal of Functional Foods*, Volume 18, 2015, 198-212.

M21a,

IF₂₀₁₅: 3,973

21. Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Nevena Stanković, Vladimir Mihailović, Milan Mladenović, Samo Kreft, Miroslav M. Vrvic, Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *Food and Function*, Volume 6, 2015, 1164-1175.

M21,

IF₂₀₁₅: 2,686

22. Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, Nevena Stanković, **Tatjana Boroja**, Milan Mladenović, Slavica Solujić, Milan S. Stanković, Miroslav M. Vrvic, Dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.): potential role as antioxidant and antimicrobial agent, *EXCLI Journal*, Volume 14, 2015, 1-20.

M22,

IF₂₀₁₅: 1,292

Саопштења са скупова међународног значаја штампана у изводу

1. **Tatjana Jurić**, Boris Popović, Bojana Blagojević, Ružica Ždero Pavlović, Nikola Mičić, Cornelian cherry leaf as an underestimated source of phytochemicals, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology (AGROFOOD)*, 20-21 June 2019, Istanbul, Turkey, p. 12, Book of Abstracts.
2. Nikola Mičić, Boris Popović, Bojana Blagojević, Ružica Ždero Pavlović, **Tatjana Jurić**, Preparation and storage temperature effect on polyphenolic content and antioxidant activity of cornelian cherry fruit jam, *International Conference on Agronomy and Food Science and Technology (AGROFOOD)*, 20-21 June 2019, Istanbul, Turkey, p. 11, Book of Abstracts.
3. Boris Popović, Ružica Ždero Pavlović, Bojana Blagojević, Nikola Mičić, **Tatjana Jurić**, Contraverses in the determination of antioxidant activity in food and biological samples - from individual determinations to PCA analysis, *International Conference on Agronomy*

and Food Science and Technology (AGROFOOD), 20-21 June 2019, Istanbul, Turkey, Book of Abstracts.

4. Bojana Blagojević, Boris Popović, Ružica Ždero Pavlović, Nikola Mičić, **Tatjana Jurić**, Determination of salicylic acid in poplar leaves under drought stress, *10th CASEE Conference "The role of life science universities in redirecting land use from threat to guardian of ecosystem"*, 12-15 June, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, pp. 30, Book of Abstracts.
5. Dragica Selaković, Nemanja Jovičić, Jelena Katanić, **Tatjana Jurić**, Vladimir Mihailović, Igor Kumburović, Davor Kumburović, Gvozden Rosić, The impact of antioxidant supplementation with *Satureja hortensis* L. extract on cisplatin-induced behavioral alterations, *Health risk, nutrition and dietary supplements: oxidative stress and polyphenols in the heart of Serbian wineries*, 20-22 June 2019, Oplenac, Topola, Serbia, p. 20, ISBN 978-86-7760-135-5.
6. Jelena Katanić, Sanja Matić, **Tatjana Boroja**, Ramazan Ceylan, Vladimir Mihailović, Snežana Stanić, Gokhan Zengin, Comparative evaluation of antimicrobial and antigenotoxic potential of two *Onosma* species from Turkey. *3rd International Conference on Plant Biology (22nd SPPS Meeting)*, 9-12 June 2018, Belgrade, Book of Abstracts.
7. ***Tatjana Boroja**, Jelena Katanić, Gvozden Rosić, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Vesna Stanković, Danijela Mišić, Vladimir Mihailović, *Alchemilla vulgaris* L.: Phytochemical profile and ameliorating effect against cisplatin-induced oxidative damage. *3rd International Conference on Plant Biology (22nd SPPS Meeting)*, 9-12 June 2018, Belgrade, Book of Abstracts.
8. Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Nemanja Jovičić, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Suzana Pantović, Gvozden Rosić, Quantitative relationship between hippocampal androgen and estrogen α receptors as a potential predictive factor in evaluation of depressive state alteration in rats, *4th Congress of Physiological Sciences of Serbia with International Participation*, 19-23 September 2018, Niš, Serbia, ISBN 978-86-900597-0-6.
9. Jovana Jovanović, Ivan Damljanić, Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Synthesis, spectral characterization and biological evaluation of 5-aryl-6-(ferrocenoyl)tetrahydro-1H(5H)-pyrazolo[1,2-a]pyrazol-1-one, *24th Young Research Fellow Meeting (24th YRFM)*, 8-10 February 2017, Châtenay-Malabry, France, Book of Abstracts p. 206.
10. ***Tatjana Boroja**, Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, Stefanie Nikles, San-Po Pan, Rudolf Bauer, Rosmarinic acid-rich extract of summer savory exhibits strong anti-inflammatory activity, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Conference-IBSC 2016*, 19-21 September 2016, Novi Sad, Serbia, p. 250-251.
11. ***Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, Gvozden Rosić, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Vesna Stanković, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Nezirina Mihović, Nephroprotective effects of *Satureja hortensis* L. against cisplatin-

- induced toxicity, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Conference-IBSC 2016*, 19-21 September 2016, Novi Sad, Serbia, p. 268-269.
12. Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Stefanie Nikles, San-Po Pan, Vladimir Mihailović, Rudolf Bauer, Garlic mustard (*Alliaria petiolata*) – unrewarded spice with antioxidant and anti-inflammatory properties, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Conference-IBSC 2016*, 19-21 September 2016, Novi Sad, Serbia, p. 215-216.
13. Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Sanja Matić, Nevena Stanković, Nezirina Mihović, Milan Mladenović, Vesna Stanković, Protective effects of *Filipendula ulmaria* extracts on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU-UNS Conference-IBSC 2016*, 19-21 September 2016, Novi Sad, Serbia, p. 256-257.
14. ***Tatjana Boroja**, Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, Stefanie Nikles, San-Po Pan, Rudolf Bauer, Milan S. Stanković, *In vitro* anti-inflammatory activity assessment of Lady's mantle, *XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, 11-14 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia, p. 83, ISBN 978-9989-760-13-6.
15. ***Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, Gvozden Rosić, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Nezirina Mihović, Hepatoprotective efficacy of summer savory against cisplatin-induced oxidative damage in rats, *XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, 11-14 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia, p. 84, ISBN 978-9989-760-13-6.
16. Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Stefanie Nikles, San-Po Pan, Gvozden Rosić, Dragica Selaković, Jovana Joksimović, Rudolf Bauer, Anti-inflammatory potential of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*): *in vitro* and *in vivo* analysis, *XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, 11-14 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia, p. 81, ISBN 978-9989-760-13-6.
17. Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, San-Po Pan, Stefanie Nikles, Rudolf Bauer, Vladimir Mihailović, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Nezirina Mihović, *Lunnaria annua* L. (annual honesty) as a new antioxidant and anti-inflammatory agent, *XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, 11-14 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia, p. 82, ISBN 978-9989-760-13-6.
18. Jelena Katanić, Stefanie Nikles, San-Po Pan, Rudolf Bauer, Vladimir Mihailović, **Tatjana Boroja**, Nevena Stanković, Milan Mladenović, Phenolic content and anti-inflammatory activity of uninvestigated *Stellaria holostea* methanolic extract, *III Simpozijum biologa i ekologe Republike Srpske*, 12-14 November 2015, Banja Luka, Republic of Srpska, p. 115, ISBN 978-99955-21-43-1.
19. Vladimir Mihailović, Mirjana Koraćević-Maslak, Jelena Katanić, Vuk Maksimović, **Tatjana Boroja**, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Phytochemical and antimicrobial evaluations of *Bergenia cordifolia* root extract, *III Simpozijum biologa i ekologe Republike*

Srpske, 12-14 November 2015, Banja Luka, Republic of Srpska, p. 119, ISBN 978-99955-21-43-1.

20. Nevena Stanković, Milan Mladenović, Sanja Matić, Snežana Stanić, Mirjana Mihailović, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, **Tatjana Boroja**, Nenad Vuković, Newly discovered chroman-2,4-diones neutralize DNA alkylation damage in vivo on TOP1A level: A story behind the molecular modeling approach, *III Simpozijum biologa i ekologa Republike Srpske*, 12-14 November 2015, Banja Luka, Republic of Srpska, p. 118, ISBN 978-99955-21-43-1.
21. Jelena Katanić, Sanja Matić, Snežana Stanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Vladimir Mihailović, **Tatjana Boroja**, *In vitro* protective effect of methanol extract of *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* against hydroxyl radical-induced oxidative damage, *III Simpozijum biologa i ekologa Republike Srpske*, 12-14 November 2015, Banja Luka, Republic of Srpska, p. 116, ISBN 978-99955-21-43-1.
22. ***Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković, *Satureja hortensis* L. as a potential antimicrobial agent, *2nd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf*, 14-17 October 2015, Plovdiv, Bulgaria, Book of Abstracts, p. 123.
23. Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, Sanja Matić, Eva M. Pferschy-Wenzig, Rudolf Bauer, Nevena Stanković, **Tatjana Boroja**, Nephroprotective effect of dropwort (*Filipendula hexapetala*) on cisplatin-induced toxicity in rats, *63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Products Research*, 23-26 August 2015, Budapest, Hungary, GA 2015, Book of Abstracts, p. 250.
24. ***Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, Milan S. Stanković, Nevena Stanković, Milan Mladenović, Antibacterial activity of Lady's Mantle, *2nd International Conference on Plant Biology*, 17-20 June 2015, Petnica, Serbia, p. 71, ISBN 978-86-912591-3-6.
25. Jelena Katanić, Sanja Matić, Snežana Stanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Vladimir Mihailović, **Tatjana Boroja**, Nenad Vuković, HPLC analysis and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula ulmaria* methanol extract, *2nd International Conference on Plant Biology*, 17-20 June 2015, Petnica, Serbia, p. 105, ISBN 978-86-912591-3-6.
26. Jelena Katanić, Sanja Matić, **Tatjana Boroja**, Ramazan Ceylan, Gokhan Zengin, Abdurrahman Aktumsek, Snežana Stanić, Vladimir Mihailović, Antimicrobial and antigenotoxic properties of *Digitalis lamarckii* endemic plant from Turkey, *2nd International Conference on Plant Biology*, 17-20 June 2015, Petnica, Serbia, p. 104-5, ISBN 978-86-912591-3-6.
27. ***Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, Nevena Stanković, Milan Mladenović, Phenolic profile and *in vitro* antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* L., *23rd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, 8-11 October 2014, Ohrid, Macedonia, p. 70, ISBN 978-9989-668-99-9.

28. Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, **Tatjana Boroja**, Nevena Stanković, Milan Mladenović, Meadowsweet as underestimated food additive against lipid peroxidation, 23rd Congress of Chemists and Technologists of Macedonia, 8-11 October 2014, Ohrid, Macedonia, p. 71, ISBN 978-9989-668-99-9.
29. Nevena Stanković, Sanja Matić, Snežana Stanić, Milan Mladenović, Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, **Tatjana Boroja**, In vivo antigenotoxic role of three selected 3-(1-aminoethylidene) chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2H-chromen-2-ones on EMS-induced DNA damage in rat liver and kidneys, V Congress of the Serbian Genetic Society, 28th September – 2nd October 2014, Kladovo, Serbia, p. 150, ISBN 978-86-87109-10-0.
30. Nevena Stanković, Milan Mladenović, Sanja Matić, Snežana Stanić, Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, **Tatjana Boroja**, Assessment of genotoxicity of eight novel 3-(1-aminoethylidene) chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-2H-chromen-2-ones, V Congress of the Serbian Genetic Society, 28th September – 2nd October 2014, Kladovo, Serbia, p. 149, ISBN 978-86-87109-10-0.

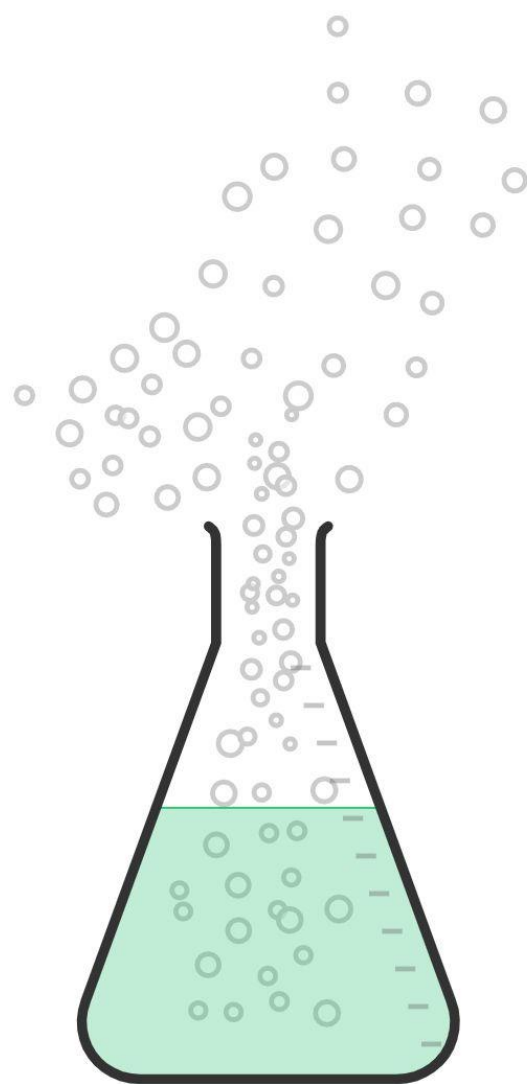
Саопштења са скупова националног значаја штампана у целини

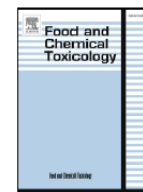
1. ***Tatjana Boroja**, Vladimir Mihailović, Jelena Katanić, Nevena Stanković, Milan Mladenović, *Alchemilla vulgaris* L. kao potencijalni izvor prirodnih antioksidanata, Zbornik radova XIX Savetovanja o biotehnologiji, 7-8. mart 2014, Čačak, str. 233-237, ISBN 978-86-87611-31-3.
2. Jelena Katanić, Vladimir Mihailović, Mirjana Koraćević-Maslak, Nevena Stanković, **Tatjana Boroja**, Milan Mladenović, Stabilnost ekstrakata korena suručice i efekat na sprečavanje lipidne oksidacije u mesu, Zbornik radova XIX Savetovanja o biotehnologiji, 7-8. mart 2014, Čačak, str. 239-244, ISBN 978-86-87611-31-3.

Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу

1. Vladimir Mihailović, Maja Arsić, Milica Stojadinović, Srna Stajić, **Tatjana Boroja**, Jelena Katanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Plodovi trnjine (*Prunus spinosa*) i gloga (*Crataegus laevigata*) kao potencijalni antioksidanti i njihova stabilnost u uslovima *in vitro* digestije, 53. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, 10-11. jun 2016, Kragujevac, str. 84, ISBN 978-86-7132-061-0.

Прилог





Summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract: Phytochemical profile and modulation of cisplatin-induced liver, renal and testicular toxicity

Tatjana Boroja^a, Jelena Katanić^a, Gvozden Rosić^b, Dragica Selaković^b, Jovana Joksimović^b,
Danijela Mišić^c, Vesna Stanković^d, Nemanja Jovičić^e, Vladimir Mihailović^{a,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^c Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia

^d Institute of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^e Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

Satureja hortensis L.
Rosmarinic acid
Cisplatin toxicity
Oxidative stress

ABSTRACT

The aim of our study was to examine the potential ameliorating effect of the methanolic extract of *Satureja hortensis* L. (summer savory) aerial parts against cisplatin-induced oxidative damage in renal, hepatic, and testicular tissues. *S. hortensis* methanol extract at the doses of 50, 100 and 200 mg/kg of body weight were orally administered to Wistar rats once daily for 10 days. Toxicity was induced by intraperitoneal injection of a single dose of cisplatin (7.5 mg/kg of body weight) on the 5th day of the experiment. Applied treatment with *S. hortensis* extract restored tissue morphology, ameliorated levels of serum parameters for liver, renal and testes function, tissue oxidative stress parameters, and increased Bcl-2/Bax ratio as an indicator of apoptosis in experimental animals caused by application of cisplatin. UHPLC/DAD/HESI-MS/MS analysis revealed that *S. hortensis* extract was rich in phenolic compounds with rosmarinic acid (24.9 mg/g) as the main compound, followed by caffeic acid (1.28 mg/g) and naringenin (1.06 mg/g). Our findings suggest that *S. hortensis* may be a valuable source of dietary and pharmacologically important phenolic compounds, especially rosmarinic acid, in pharmaceutical and functional food formulations in order to maintain normal health conditions or as a remedy in various diseases caused by oxidative damage.

1. Introduction

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP) is one of the most effective and widely applied antineoplastic agents (Lebwohl et al., 1998). Despite its well-documented efficacy in the treatment of a variety of tumours, clinical use of cisplatin is often limited because of the dose- and duration-dependent cell resistance. In addition, its non-specific action leads to detrimental effects on morphology and functions of vital tissues, which primarily occur in kidneys (Bunel et al., 2015), testes (Sherif et al., 2014) and liver (Iseri et al., 2007). The exact molecular and biochemical mechanism of tissue injury induced by cisplatin has not been well-explained, although several hypotheses suggest that cisplatin toxicity is related with generation of reactive oxygen and nitrogen species, which leads to the shattered metabolism of glutathione, increased level of thiobarbituric acid reactive substances, mitochondria malfunction, and impairment of enzymatic antioxidant defence (Ajith et al., 2007). According to Karasawa and Steyger (2015), the key mechanisms involved in cisplatin toxicity include oxidative stress,

inflammation, and apoptosis in tissue. Medicinal plants have been recognized as an important source of dietary phytochemicals with a strong antioxidant activity which, when administered along with chemotherapeutic agents, provide better efficacy of chemotherapeutic drugs and attenuate vital tissue toxicity (Moon et al., 2013; Singh et al., 2015; Yadav, 2015).

Satureja hortensis L., commonly known as summer savory, belongs to family Lamiaceae. It is an annual herbaceous shrub growing approximately 30–60 cm in height, with tiny purple flowers and slender bronze-green aromatic leaves on hairy stems. In traditional and folk medicine across the Europe and Mediterranean region, dried aerial parts of *S. hortensis* have been used in the treatment of various diseases, especially for cramps, nausea, indigestion, and gastrointestinal disorders. Phytochemical investigations revealed that *Satureja* species are composed of volatile oil, phenolic compounds, sterols, and tannins. Regarding the presence of dominating components in the essential oil, monoterpene hydrocarbons thymol, carvacrol, γ -terpinene, and *p*-cymene and their derivatives (Skočibušić and Bezić, 2004; Sefidkon and

* Corresponding author.

E-mail address: vladam@kg.ac.rs (V. Mihailović).

The biological activities of roots and aerial parts of *Alchemilla vulgaris* L.T. Boroja^{a,*}, V. Mihailović^a, J. Katanić^a, S.-P. Pan^b, S. Nikles^b, P. Imbimbo^c, D.M. Monti^c, N. Stanković^a, M.S. Stanković^d, R. Bauer^b^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia^b Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacognosy, University of Graz, Universitaetsplatz 4/1, 8010 Graz, Austria^c Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, Complesso Universitario Monte Sant'Angelo, via Cinthia 4, 80126 Naples, Italy^d Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2017

Received in revised form 9 March 2018

Accepted 20 March 2018

Available online 13 April 2018

Edited by AO Aremu

Keywords:

Alchemilla vulgaris

Lady's mantle

Antioxidant activity

Antimicrobial activity

Biocompatibility

Anti-inflammatory activity

ABSTRACT

Medicinal plants are considered to be a major source of biologically active compounds, which provides unlimited opportunities for their use either as medical treatments or as novel drug formulations.

The focus of our study was on basic phytochemical analysis and *in vitro* examination of the biological activity of *Alchemilla vulgaris* L. Methanolic extracts of above ground parts and roots of *A. vulgaris* (AVA and AVR, respectively) were prepared by maceration for 72 h. Phytochemical profile of extracts was evaluated by spectrophotometric determinations of phenolic compounds and HPLC-PDA analysis. AVA and AVR were analysed for their antioxidant efficacy as total antioxidant capacity, metal chelation and reducing power ability, inhibition of lipid peroxidation as well as their potential to neutralise DPPH, ABTS, and OH radicals. Microdilution method was employed to investigate the antibacterial and antifungal activity of extracts against nine ATCC and isolates of bacteria and ten fungal strains from biological samples. Anti-inflammatory activity of the extracts was evaluated using cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) assays and the assay for determination of COX-2 gene expression, while biocompatibility of extracts was assessed by MTT assay.

Our results revealed the high amount of phenolic compounds in both extracts; especially they were rich in condensed tannins. Ellagic acid and catechin were tentatively identified in AVA and AVR, respectively. Full biocompatibility as well as remarkable bioactivity were observed for both extracts in all employed assays, so our further investigations will be focused on the identification of active constituents in *A. vulgaris* and the molecular mechanisms of their action.

© 2018 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Several lines of evidence support the hypothesis that secondary metabolites from plants (e.g. flavonoids and phenolic acids) may play an antioxidant role and diminish the adverse effects of an imbalance between the production of enzymatic and non-enzymatic antioxidants and overproduction of free radicals in oxidative stress (Hussein and Khalifa, 2014). As a result of their antioxidant activity, either through their reducing capacity or through potential influences on intracellular redox processes, phenolic compounds manifest various beneficial

effects, including anti-inflammatory and anticarcinogenic activities (Han et al., 2007; Li et al., 2014).

Alchemilla vulgaris L. (Lady's mantle), an herbaceous perennial plant belonging to the Rosaceae family, is widely spread across Europe and Asia and commonly known in traditional medicine for treatment of ulcers, wounds, eczema, and digestive problems as well as a remedy for gynaecological disorders, such as heavy menstrual flow, menorrhagia and dysmenorrhoea (Jarić et al., 2015; Masullo et al., 2015; Ilić-Stojanović et al., 2017). *Alchemilla* species have been reported to exert a variety of biological activities, including antiviral, antioxidant, antiproliferative, and antibacterial activity as well as healing effects on cutaneous wounds in rats (Trouillas et al., 2003; Shrivastava and John, 2006; Filippova, 2017). Previous findings showed that aerial parts of *A. vulgaris* comprise mostly phenolic compounds – a large amount of tannins, phenolic acids (predominantly ellagic acid, gallic, and caffeic acids), flavonoids (quercetin), and flavonoid glycosides (isoquercetin, rutin, avicularin, and tiliroside) (Møller et al., 2009). To the extent of our knowledge, there is a scarce literature on phytochemical profile and biological activity of roots of *A. vulgaris*.

Abbreviations: AVA, *Alchemilla vulgaris* aerial parts methanolic extract; AVR, *Alchemilla vulgaris* roots methanolic extract; ROS, reactive oxygen species; COX-1, cyclooxygenase-1; COX-2, cyclooxygenase-2; PGH₂, prostaglandin H₂; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; IL, interleukin; TNF-α, tumour necrosis factor α; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NF-κB, the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; DEX, dexamethasone.

* Corresponding author.

E-mail address: tatjanaboroja@gmail.com. (T. Boroja).



Protective effects of *Alchemilla vulgaris* L. extracts against cisplatin-induced toxicological alterations in rats

Tatjana Jurić^{a,b,*}, Jelena S. Katanić Stanković^c, Gvozden Rosić^d, Dragica Selaković^d, Jovana Joksimović^d, Danijela Mišić^e, Vesna Stanković^f, Vladimir Mihailović^{a,*}

^a Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, 21000 Novi Sad, Serbia

^c Department of Science, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

^d Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^e Institute for Biological Research "Siniša Stanković" - National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia

^f Institute of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article History:

Received 24 May 2019

Revised 11 August 2019

Accepted 13 September 2019

Available online xxx

Edited by L Verschaeye

Keywords:

Alchemilla vulgaris L.

Cisplatin

Ellagic acid

Oxidative stress

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the possible effect of methanol extracts of aerial parts and roots of *Alchemilla vulgaris* L. (AVA and AVR, respectively) in preventing cisplatin-induced hepatorenal and testicular toxicity in rats. UHPLC/DAD/(–)HESI-MS/MS analysis was performed to determine the detailed phenolic profile of AVA and AVR. The male Wistar rats were orally treated with extracts at three different concentrations (50, 100, and 200 mg/kg b.w.) for 10 days and toxicity was induced by injection of single dose of cisplatin on the 5th day (7.5 mg/kg b.w.). Determination of serum biochemical markers of hepatorenal and testicular tissue injury, as well as oxidative-stress parameters in tissues and histopathological study, were performed. Treatments with AVA and AVR significantly attenuated the levels of serum parameters of liver, kidneys and testicles injury, tissue's morphology and parameters of oxidative stress caused by an application of the cisplatin. Chromatographic analysis showed the presence of more than 20 different phenolic compounds in extracts where ellagic acid, catechin, and catechin gallate were dominant components in both extracts. The obtained results indicate that *A. vulgaris* extracts may be used in preventing cisplatin-induced toxicity during chemotherapy as well as in the treatment of oxidative stress-related disorders.

© 2019 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum (II); CDDP) is one of the most commonly used chemotherapeutic agents in the treatment of a wide range of cancers, but the main setback of its clinical use is documented resistance and tendency of cisplatin to elicit toxicity in tissues (Fukasawa et al., 2014). The main disadvantage of chemotherapeutic drugs use, including cisplatin, is poor selectivity between cancerous and normal tissues. Consequently, fast-growing cancer cells absorb cisplatin, but at the same time, it could be absorbed in other fast-growing tissues. Cisplatin side effects caused by fast-growing tissues damage include gastrointestinal toxicities, bone marrow injury, the loss of hair (alopecia), and ototoxicity (ear damage). Cisplatin also displays nephrotoxicity since excretion of the drugs occurs via kidneys and hepatotoxicity because the liver function is to metabolise and detoxify the drugs and xenobiotics.

These metabolic processes in kidneys and liver allow cisplatin to be taken up by cells in both organs and cause toxic effects (Oun, Moussa, and Wheate, 2018). Reproductive organs are also vulnerable to chemotherapy drugs. This kind of toxicity has attracted the attention of many researchers because the process of chemotherapy may lead to infertility alteration (Haghi-Aminjan et al., 2018).

Extensive investigations have been conducted for many years to underline the molecular mechanisms of cisplatin side effects. Recent studies suggest that tissue injury caused by cisplatin can be partly explained by oxidative damage, inflammatory processes, fibrogenesis as well as apoptotic processes (Abdel-Daim et al., 2019a; Li et al., 2018). Because the use of cisplatin could not be abandoned in the contemporary anticancer therapy considering its high efficacy, the scientific focus is on the investigation of a novel auxiliary therapy for the attenuation of cisplatin-induced toxicity, but without negative effects on its antitumor activity. Natural products and phytochemicals are regarded as a promising strategy for the prevention of cisplatin-induced toxicity because of their remarkable and well-documented antioxidant, anti-proliferative, anti-inflammatory, and antitumor activities (Puren, Seth, and Bhatt, 2018). Therefore, novel

*Corresponding author.

E-mail addresses: tatjana.juric@polj.uns.ac.rs (T. Jurić), vladimir.mihailovic@pmf.kg.ac.rs (V. Mihailović).

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Татјана М. Јурић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

"Испитивање биљних врста *Alchemilla vulgaris* L. и *Satureja hortensis* L.: фитохемијски профил и биолошка активност у *in vitro* и *in vivo* условима"

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 2020. године

Татјана Јурић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Татјана М. Јурић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

"Испитивање биљних врста *Alchemilla vulgaris* L. и *Satureja hortensis* L.: фитохемијски профил и биолошка активност у *in vitro* и *in vivo* условима"

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

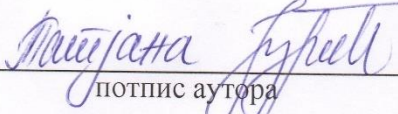
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- ⑤) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 2020. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>