УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Јелена Катанић

Фитохемијска и фармаколошка карактеризација одабраних биљних врста рода *Filipendula* Mill. (Rosaceae)

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Доц. др Владимир Михаиловић

Крагујевац, 2017.

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF SCIENCE

Jelena Katanić

Phytochemical and pharmacological characterization of selected plant species of the genus *Filipendula* Mill. (Rosaceae)

PhD THESIS

Mentor: PhD Vladimir Mihailović, Assistant Professor

Kragujevac, 2017

I Аутор

Име и презиме: **Јелена Катанић**
Датум и место рођења: **20.10.1988. године, Чачак, Србија**
Садашње запослење: **истраживач сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу**

II Докторска дисертација

Наслов: **Фитохемијска и фармаколошка карактеризација одабраних биљних врста рода *Filipendula* Mill. (Rosaceae)**
Број страница: **278**; Број слика: **45**; Број схема: **31**; Број табела: **26**;
Број библиографских података: **402**
Установа и место где је израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**
Научна област (УДК): **Хемија – Биохемија (577.1)**
Ментор: **др Владимир Михаиловић**, доцент, Природно-математички факултет, Крагујевац

III Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: **23.09.2015. године**

Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: *1110/XIV-2, 18.11.2015.; IV-01-719/5, 09.12.2015.*

Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: *900/IX-3, 30.09.2015.; IV-01-532/7, 14.10.2015.*

1. **др Владимир Михаиловић**, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу; *Ужа научна област:* Биохемија
2. **Dr. Rudolf Bauer**, Univ.-Professor (др Рудолф Бауер, редовни професор), Institute of Pharmaceutical Sciences, Karl-Franzens University, Graz, Austria; *Ужа научна област:* Фармацеутска биологија и фармакогнозија
3. **др Мирослав М. Врвић**, редовни професор, Хемијски факултет, Универзитет у Београду; *Ужа научна област:* Биохемија
4. **др Милан Младеновић**, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу; *Ужа научна област:* Биохемија

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: _____

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: *310/VII-1, 26.04.2017.; IV-01-478/9, 10.05.2017.*

1. **др Данијела Мишић,** виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду; *Научна област:* Биологија, *председник Комисије*
2. **Dr. Rudolf Bauer**, Univ.-Professor (др Рудолф Бауер, редовни професор), Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacognosy, Karl-Franzens University, Graz, Austria; *Ужа научна област:* Фармацеутска биологија и фармакогнозија, *члан*
3. **др Гвозден Росић**, редовни професор, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу; *Ужа научна област:* Физиологија, *члан*
4. **др Милан Младеновић**, доцент, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу; *Ужа научна област:* Биохемија, *члан*
5. **др Владимир Бешкоски**, доцент, Хемијски факултет, Универзитет у Београду; *Ужа научна област*: Биохемија, *члан*

Датум одбране дисертације: _____**2017. године**

Докторска дисертација „Фитохемијска и фармаколошка карактеризација одабраних биљних врста рода Filipendula Mill. (Rosaceae)“ урађена је у Лабораторији за биохемију и хемију природних производа, Института за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Део експеримената урађен је у Лабораторији за генетику, Института за биологију и екологију истог факултета; на Институту за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду; на Катедрама за патологију и физиологију, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу и на Катедри за фармакгнозију, Института за фармацеутске науке, Универзитета Карл-Франц у Грацу, Аустрија.

Ментор:

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

Чланови Комисије:

***др Данијела Мишић,** председник Комисије,*
виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Универзитет у Београду

***Dr. Rudolf Bauer**, Univ.-Professor (редовни професор),*
Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacognosy, Karl-Franzens University, Graz, Austria

---

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

***др Милан Младеновић**, доцент,*
Природно-математички факултет,
Универзитет у Крагујевцу

***др Владимир Бешкоски,** доцент,*
Хемијски факултет,
Универзитет у Београду

САДРЖАЈ

ПРЕДГОВОР i

РЕЗИМЕ iii
SUMMARY v

СКРАЋЕНИЦЕ vii

Листа слика xi
Листа схема xiii
Листа табела xv

1. УВОД 1

2. ОПШТИ ДЕО 8

2.1. Опште карактеристике, традиционална употреба и фармаколошко дејство одабраних врста рода *Filipendula* Mill. (Rosaceae) 9
2.1.1. *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. - медуника 12
2.1.2. *Filipendula hexapetala* Gilib. - суручица 17
2.2. Преглед најзаступљенијих секундарних метаболита биљних врста из рода *Filipendula* Mill. 19
2.3. Секундарни метаболити биљака 34
2.3.1. Биосинтетички путеви фенолних једињења у биљкама 34
2.3.2. Биолошка активност и терапеутски потенцијал фенолних једињења 43
2.4. Оксидативни стрес и антиоксидативни потенцијал лековитих биљака 46
2.5. Лековите биљке као извори антимикробних супстанци 53
2.6. Инфламација и антиинфламаторна активност лековитих биљака 57
2.7. Нефро- и хепатопротективни ефекти лековитих биљака 65

3. ЦИЉЕВИ РАДА 75

4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО 78

4.1. Сакупљање биљног материјала и припрема сувих екстраката 79
4.2. Одређивање количине фенолних једињења у биљним екстрактима 80
4.2.1. Одређивање укупне количине фенолних једињења 80

4.2.2. Одређивање укупне количине флавоноида 80
4.2.3. Одређивање укупне количине флавонола 81
4.2.4. Одређивање укупне количине фенолних киселина 82
4.2.5. Одређивање укупне количине кондензованих танина 83
4.2.6. Одређивање укупне количине галотанина 83
4.2.7. Одређивање количине мономерних и укупних антоцијана 84
4.3. Стандардизација испитиваних екстраката 85
4.3.1. Стандардизација применом танкослојне хроматографије (TLC) 86
4.3.2. Стандардизација применом танкослојне хроматографије високих перформанси (HPTLC) 87
4.4. Анализа хемијског састава испитиваних екстраката 88
4.4.1. HPLC анализа и квантификација одабраних фенолних једињења 88
4.4.2. LC-MS анализа биљних екстраката 89
4.5. Испитивање антиоксидативне активности 91
4.5.1. Укупна антиоксидативна активност 91
4.5.2. Одређивање способности неутрализације DPPH· радикала 91
4.5.3. Одређивање капацитета „хватања“ $ABTS^{+\cdot}$ радикал катјона 92
4.5.4. Одређивање капацитета „хватања“ $O_2^{\cdot-}$ радикала 94
4.5.5. Одређивање капацитета „хватања“ NO· радикала 95
4.5.6. Редуктивна активност 96
4.5.7. Капацитет хелатације 97
4.5.8. Одређивање инхибиције липидне пероксидације 98
4.5.8.1. Гвожђе-тиоцијанатна (FCT) метода (модел систем емулзија уље/вода) 98
4.5.8.2. β-каротен/линолна киселина модел систем 99
4.5.8.3. Инхибиција липидне оксидације у месу (месо – модел систем) 100
4.5.9. Испитивање стабилности биљних екстраката 102
4.5.9.1. Испитивање стабилности у зависности од промене pH вредности 102
4.5.9.2. Испитивање стабилности у зависности од промене температуре 103
4.5.9.3. Испитивање стабилности у току *in vitro* дигестије 103
4.6. Испитивање антимикробне активности 105
4.6.1. Коришћени микроорганизми 105
4.6.2. Припрема микроорганизама 106
4.6.3. Микродилуциона метода 106
4.6.3.1. Одређивање антибактеријске активности 107
4.6.3.2. Одређивање антифунгалне активности 108
4.7. Испитивање цитотоксичности 109
4.7.1. Коришћене ћелијске линије 109
4.7.2. Испитивање антипролиферативне активности XTT методом 110
4.8. *In vitro* испитивање антиинфламаторне активности 110
4.8.1. Инхибиција ензимске активности циклооксигеназе-1 (COX-1) и циклооксигеназе-2 (COX-2) 110
4.8.2. Инхибиција експресије NF-κB/COX-2 гена 112
4.8.2.1. Коришћене ћелијске линије 113
4.8.2.2. Екстракција РНК и реверсна транскрипција ланчане реакције полимеразе (RT-PCR) 114

4.8.2.3. Real-time PCR 114
4.9. *In vivo* испитивање антиинфламаторне активности 114
4.9.1. Експерименталне животиње 114
4.9.2. Испитивање антиноцицептивне активности (тест вруће плоче) 115
4.9.3. Испитивање антиедематозне активности (карагенан-индукована акутна инфламација) 116
4.10. *In vivo* испитивање нефропротективне и хепатопротективне активности екстраката код стања токсичности изазваног цисплатином 117
4.10.1. Експерименталне животиње 117
4.10.2. Нефро- и хепатопротективна активност – дизајн експеримента 118
4.10.3. Одређивање биохемијских маркера у серуму 120
4.10.3.1. Одређивање количине укупних протеина 120
4.10.3.2. Одређивање активности аланин трансаминазе (ALT) 121
4.10.3.3. Одређивање активности аспартат трансаминазе (AST) 122
4.10.3.4. Одређивање активности алкалне фосфатазе (ALP) 123
4.10.3.5. Одређивање активности гама-глутамил трансферазе (γ-GT) 124
4.10.3.6. Одређивање концентрације уреe 125
4.10.3.7. Одређивање концентрације креатинина 127
4.10.3.8. Одређивање концентрације мокраћне киселине 128
4.10.4. Одређивање маркера оксидативног стреса у хомогенатима ткива бубрега и јетре 129
4.10.4.1. Одређивање количине укупних протеина 129
4.10.4.2. Одређивање активности каталазе (CAT) 130
4.10.4.3. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD) 131
4.10.4.4. Одређивање садржаја редукованог глутатиона (GSH) 133
4.10.4.5. Одређивање садржаја тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци (TBARS) 134
4.10.5. Хистопатолошко испитивање ткивних исечака бубрега и јетре пацова 136
4.10.6. Испитивање генотоксичности 136
4.10.6.1. Одређивање степена оштећења ДНК (алкална верзија Комет теста) 136
4.10.6.2. Класификација и дефинисање укупног скора оштећења ДНК 137
4.11. Статистичка обрада података 138

5. РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА 139

I ФИТОХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА 140

5.1. Количина фенолних једињења у екстрактима биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 140
5.2. TLC и HPTLC стандардизација екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 142
5.3. HPLC анализа екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 145
5.4. LC-MS анализа екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 150

II ФАРМАКОЛОШКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА 172

5.5. Антиоксидативна активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 172
5.5.1. Антиоксидативна активност на нивоу слободних радикала, хелатационог и редукционог капацитета 172
5.5.2. Инхибиција липидне пероксидације 177
5.5.3. Стабилност испитиваних екстраката (pH, термална и у току *in vitro* дигестије) 181
5.6. Антимикробна активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 185
5.6.1. Антибактеријска активност 185
5.6.2. Антифунгална активност 188
5.7. Цитотоксична активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 190
5.8. Антиинфламаторна активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 192
5.8.1. *In vitro* антиинфламаторна активност 192
5.8.2. *In vivo* антиинфламаторна активност 194
5.8.2.1. Антиноцицептивна активност 194
5.8.2.2. Антиедематозна активност 196
5.9. Нефропротективна и хепатопротективна активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* 200
5.9.1. Промена телесне масе експерименталних животиња и промена у маси испитиваних органа 200
5.9.2. Биохемијски параметри у серуму експерименталних животиња 201
5.9.3. Параметри оксидативног стреса у ткиву бубрега и јетре експерименталних животиња 205
5.9.4. Хистопатолошко испитивање препарата ткива бубрега и јетре експерименталних животиња 210
5.9.5. Генотоксичност и антигенотоксично деловање 219

6. ДИСКУСИЈА 224

7. ЗАКЉУЧАК 248

8. ЛИТЕРАТУРА 252

БИОГРАФИЈА 267

БИБЛИОГРАФИЈА 269

ПРИЛОГ 278

ПРЕДГОВОР

Докторска дисертација пред вама представља оригиналан научни допринос познавању и разумевању хемијских и фармаколошких особина биљних врста из рода Filipendula Mill. Израда ове докторске дисертације је реализована у оквиру пројекта (ИИИ 43004), финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Како би дошло до остварења идеје о реализацији ових истраживања заслужан је велики број особа које су помогле у овом поступку, свако на свој начин и у правом тренутку.

Велику захвалност првенствено дугујем проф. др Ленки Рибић-Зеленовић, која ми је показала све лепоте хемије и једна је од особа заслужних за мој избор управо овог „хемијског" пута. Захваљујем се проф. др Славици Солујић, редовном професору у пензији, на идеји о проучавању ових биљних врста, као и на усмеравању и несебичним саветима на самом почетку мојих докторских студија. Свакако, у току читавог овог процеса велико знање, многобројне идеје, изузетну помоћ и подршку добијала сам од свог ментора доц. др Владимира Михаиловића, који је, поред тога, умногоме допринео мом осамостаљивању на научно-истраживачком путу. На свему томе сам му неизмерно захвална. Мојим драгим колегама из Лабораторије за биохемију и хемију природних производа, Природно-математичког факултета, који су били или су и даље део овог колектива, Татјани Бороја, Невени Станковић, Мирјани Корађевић-Маслак, Незрини Миховић и доц. др Милану Младеновићу велико хвала на проведеним дивним данима у њиховом друштву, помоћи у великом броју експерименталних истраживања, на прегледању рукописа ове дисертације и изузетној колегијалности.

Желим да се захвалим ментору и члановима комисије на темељном прегледању писаног материјала, на корисним саветима и сугестијама које су значајно допринеле квалитету ове дисертације. Захваљујем се и: доц. др Милану С. Станковићу са Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу за сакупљање и идентификацију биљног материјала; др Сањи Матић, научном сараднику са Института за биологију и екологију истог факултета, за изузетно изведене in vivo експерименте и испитивања гено- и антигенотоксичности, као и за велику помоћ и подршку; др Весни Станковић са Факултета медицинских наука у Крагујевцу за хистопатолошке анализе; истраживачкој групи проф. др Рудолфа Бауера са Института за фармацију, Универзитета у Грацу, Аустрија, (Еви, Штефани, Надин, Сан-Поу и Фолкеру), као и професору Бауеру лично, захваљујем се на пруженој прилици за усавршавање и стицање нових знања и искустава, као и искреним саветима у правом тренутку; проф. др Гвоздену Росићу и његовим сарадницама са Катедре за физиологију Факултета медицинских наука у Крагујевцу хвала на великој помоћи при спровођењу у дело идеје о испитивању in vivo антиинфламаторне активности. Свим професорима и сарадницима са Института за хемију хвала на знањима и саветима које су ми пружали у току студија.

Мојој породици, мами Славици и нани Живки, као и свим мојим пријатељима и најмилијима, искрено се захваљујем на разумевању и љубави коју ми пружају. Мом Игору хвала на безграничној подршци и снази коју ми даје, и бескрајно сам му захвална на томе што ми, увек када је то најпотребније, даје ветар у леђа и шаље позитивне мисли. Такође, хвала му на изузетној помоћи око великог броја детаља и графичких решења чиме је омогућено да дисертација у оваквом облику угледа светлост дана.

Ову дисертацију посвећујем мојој мами, за сву љубав, разумевање и подршку коју ми је пружала у најтежим животним тренуцима, за све што је стоички поднела и све чега се одрицала зарад моје среће и успеха. Хвала јој што је веровала у мене и моје снове и надам се је на овај начин остварен само мали део моје жеље да јој покажем да ништа од тога није било узалуд.

За тебе мама!

Јелена

„Per aspera ad astra!”

РЕЗИМЕ

Две биљне врсте из рода *Filipendula* Mill. (фамилија Rosaceae), *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. и *Filipendula hexapetala* Gilib., познате као медуника и суручица, су вишегодишње биљке које се могу наћи на дивљим и култивисаним стаништима у Европи и Азији. Обе биљке су коришћене у традиционалној медицини многих европских земаља, укључујући и Србију, захваљујући њиховим диуретичким, антиреуматским и антиинфламаторним особинама. Међутим, научних сазнања о хемијском саставу *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, као и њиховој биохемијској активности и фармаколошким ефектима је врло мало. У том смислу, главни циљ ове докторске дисертације био је одредити фитохемијски садржај и фармаколошки потенцијал ових биљака. У оквиру ових истраживања коришћени су метанолни екстракти надземних делова и корена *F. ulmaria* (FUA и FUR) и *F. hexapetala* (FHA и FHR).

За одређивање хемијског састава испитиваних екстраката примењено је неколико различитих техника, укључујући спектрофотометријске методе за одређивање садржаја једињења фенолног типа, заједно са стандардним хроматографским процедурама и хроматографским процедурама високих перформанси (TLC, HPTLC, HPLC и LC-MS) за квалитативну и квантитативну анализу садржаја фенола. Задатак фармаколошког дела студије био је истражити антиоксидативну активност испитиваних метанолних екстраката, њихов потенцијал у различитим модел системима, као и одређивање pH, термалне и гастроинтестиналне стабилности. Затим су примењене методе за одређивање антимикробне активности на одабраним бактеријским и фунгалним сојевима и цитотоксичности на три различите ћелијске линије. Такође, у оквиру ове дисертације испитиван је антиинфламаторни ефекат *F. ulmaria* and *F. hexapetala* у смислу њиховог утицаја на ензимску активност циклооксигеназа (COX-1 и COX-2) и утврђивање антиинфламаторног потенцијала, у *in vitro* и у *in vivo* условима. Штавише, активност испитиваних екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* у борби против стања оксидативног стреса изазваног цисплатином била је испитивана преко одређивања биохемијских параметара серума и ткива (бубрега и јетре), као и праћењем хистопатолошких промена и нивоа гено- и антигенотоксичности.

Резултати спектрофотометријских анализа *F. ulmaria* и *F. hexapetala* показали су знатну количину укупних фенолних једињења у екстрактима, нарочито флавоноида и фенолних киселина у надземним деловима и кондензованих танина и галотанина у екстрактима корена. Приликом TLC и HPTLC анализа FUA екстракт показао је присуство рутина, спиреозида и изокверцитрина, а у FHA екстракту детектовани су кверцетин, спиреозид, хиперозид и изокверцитрин. Применом HPLC-PDA методе потврђено је присуство спиреозида, као референтне компоненте, у екстрактима надземних делова обе биљне врсте. Присуство скоро свих стандардних једињења било је ограничено на надземне делове ове две биљке, док су у екстрактима корена детектовани углавном само катехин и епикатехин. Након хидролизе екстраката потврђено је да надземни делови

садрже деривате кверцетина и кемпферола које нисмо могли детектовати HPLC анализом у нехидролизованим екстрактима. Даље, применом LC-MS анализе потврђено је да сви испитивани екстракти поседују различите класе фенолних једињења (око 50 различитих једињења), већином фенолних киселина, флавоноида, танина и њихових деривата. Екстракти су испољили високу актиоксидативну активност у поређењу са референтним антиоксидантима, паралелно са њиховим значајним активностима у процесу липидне оксидације и великом стабилношћу у различитим условима. Екстракти су показали антимикробне ефекте на различите испитиване микроорганизме, посебно на бактерије *E. coli* и *E. faecalis* (MIC 0.156–0.625 mg/mL), као и гљиве *P. cyclopium* и *F. oxysporum* (MIC 2.5–5 mg/mL). *F. ulmaria* и *F. hexapetala* екстракти (FUA, FUR, FHA и FHR) нису испољили *in vitro* цитотоксичну активност у свим испитиваним концентрацијама (IC_{50} > 50 μg/mL). Сви тестирани екстракти у концентрацији од 50 μg/mL инхибирају ензимску активност COX-1 и -2, при чему су FUA и FHA екстракти били скоро дупло ефикаснији од екстраката корена одговарајућих биљака, са изузетком инхибиције COX-2 од стране FHR екстракта (52.21%). Тестирани материјали су врло слабо инхибирали експресију COX-2 гена у THP-1 ћелијама, у концентрацији од 25 μg/mL. У тесту вруће плоче, код пацова из соја Wistar, сви екстракти, а посебно екстракти биљке *F. hexapetala*, у две дозе (100 и 200 mg/kg т.м.), изазвале су пораст времена латенције у поређењу са контролном групом (p < 0.05). У тесту акутне инфламације индуковане карагенаном, испитивани екстракти у дозама од 100 и 200 mg/kg т.м., делимично или значајно редукују максимални оток шапе пацова све до 6 h третмана. Изложеност цисплатини у дози од 7.5 mg/kg проузроковала је значајан пораст биохемијских параметара крви који указују на промену у нормалном функционисању јетре и бубрега и маркера оксидативног стреса у ткивима, праћено неким хистопатолошким променама у ткиву бубрега и јетри експерименталних животиња и високим нивоом генотоксичности. Администрација екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* у три различите концентрације (100, 200 и 400 mg/kg/дан) у трајању од 10 дана, резултовала је смањењем оксидативног стреса у ткивима и опадањем серумских параметара. Такође, испитивани екстракти смањили су генотоксичност цисплатине.

Резултати добијени као део свеобухватног експерименталног рада на овој докторској дисертацији сугеришу да су екстракти обе испитиване лековите биљке прилично богати фенолним једињењима која су позната по разноврсности њихових биолошких активности. Екстракти потенцијално могу бити састојци функционалне хране или се могу користити као дијететски и фармацеутски суплементи, узимајући у обзир њихову добру антиоксидативну и антимикробну активност и стабилност у различитим условима. Добијени резултати *in vitro* и *in vivo* антиинфламаторне активности екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* пружају подршку традиционалној примени ових биљака у третману различитих запаљенских стања. Даља истраживања једињења са антиинфламаторним особинама, која се могу изоловати из ових биљака, моћи ће да открију тачан механизам деловања ових екстраката. Екстракти изабраних биљака из рода *Filipendula*, богати фенолним једињењима, умањују оксидативни стрес у бубрезима и јетри, смањују оштећење ткива и побољшавају антиоксидативни статус експерименталних животиња током апликације цисплатине. Стога, ови резултати указују да екстракти *F. ulmaria* и *F. hexapetala* могу бити коришћени као помоћни агенси за превенцију и ублажавање нежељених ефеката цисплатине као што су нефро- и хепатотоксичност, али уз дефинисање одговарајуће терапеутске дозе.

SUMMARY

Two plant species from genus *Filipendula* Mill. (fam. Rosaceae), namely *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula hexapetala* Gilib., known as meadowsweet and dropwort, are perennial herbs found in wild and cultivated habitats in Europe and Asia. Both of them have been used in traditional medicine of most European countries including Serbia, based on theirs diuretic, antirheumatic and anti-inflammatory properties. However, there is little scientific evidence on chemical composition of *F. ulmaria* and *F. hexapetala* as well as their biochemical activity and pharmacological effects. In that regard, the main purpose of this PhD thesis was to evaluate the phytochemical composition and pharmacological potential of these plants. In this study were used methanolic extracts of aerial parts and roots of *F. ulmaria* (FUA and FUR) and *F. hexapetala* (FHA and FHR).

For the phytochemical characterization several different techniques were applied, including spectrophotometrical methods for determination of the composition of different classes of phenolic compounds, together with standard and high performance chromatographical procedures (TLC, HPTLC, HPLC and LC-MS) for evaluation of phenolic composition qualitatively and quantitatively. The aim of pharmacological part of the study was to investigate the antioxidant activity of the tested methanolic extracts, their potential in different model systems, as well as pH, thermal and gastrointestinal stability studies. In addition, assays for determination of antimicrobial activity on selected bacterial and fungal strains and cytotoxicity on three different cell lines were carried out. Also, in this Dissertation were evaluated *F. ulmaria* and *F. hexapetala* anti-inflammatory effects regarding theirs impact on cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) enzymatic activity and assessment of anti-inflammatory potential, both in *in vitro* and *in vivo* conditions. Moreover, activity of the tested extracts of *F. ulmaria* and *F. hexapetala* against cisplatin-induced oxidative stress *in vivo* was estimated via determination of serum and tissues (kidneys and liver) biochemical parameters, as well as monitoring histopathological changes and the levels of geno- and antigenotoxicity.

The results of spectrophotometrical analysis of *F. ulmaria* and *F. hexapetala* showed considerable total content of phenolic compounds in the extracts, especially flavonoids and total phenolic acids in aerial parts and condensed tannins and gallotannins in root extracts. In TLC and HPTLC analysis FUA extract showed the presence of rutin, spiraeoside and isoquercitrin and in FHA extract quercetin, spiraeoside, hyperoside and isoquercitrin were detected. HPLC-PDA analysis indicated presence of spiraeoside, as a reference compound, in the aerial part extracts of both plant species. The presence of almost all standard phenolic compounds was limited to the aerial parts of these two plants, whereas the root extracts contain only catechin and epicatechin. After hidrolysis of the extracts was confirmed that the aerial part extracts contain several derivatives of quercetin and kaempferol that we were unable detect via HPLC analysis before the hydrolysis. Further, in LC-MS analysis it was confirmed that all tested extracts possess a variety of phenolic compounds (around 50 different compounds), mainly phenolic acids, flavonoids, tannins and their derivatives. The extracts exerted high antioxidant

activities compared to the reference antioxidants, paralleled by their considerable activities against lipid oxidation process and great stability in different conditions. The extracts revealed an interesting antimicrobial effect against the tested microorganisms, especially bacteria *E. coli* and *E. faecalis* (MIC 0.156–0.625 mg/mL), and fungi *P. cyclopium* and *F. oxysporum* (MIC 2.5–5 mg/mL). *F. ulmaria* and *F. hexapetala* extracts (FUA, FUR, FHA and FHR) had no *in vitro* cytotoxic activity at all applied concentrations (IC_{50} > 50 μg/mL). All tested extracts at a concentration of 50 μg/mL were able to inhibit COX-1 and -2 enzyme activities, whereby FUA and FHA extracts were double as effective as the root extracts of respective plants, with the exception of COX-2 inhibition by FHR extract (52.21%). Extracts hardly inhibited the level of COX-2 gene expression in THP-1 cells, at a concentration of 25 μg/mL. In the hot plate test using Wistar rats, all extracts, but especially extracts of *F. hexapetala*, in two doses (100 and 200 mg/kg b.w.), exhibited an increase in latency time when compared with the control group (p < 0.05). In the carrageenan-induced acute inflammation test, tested extracts at doses of 100 and 200 mg/kg b.w., were able to moderately or significantly reduce the mean maximal swelling of rat paw until 6 h of treatment. Exposure to cisplatin at a dose 7.5 mg/kg caused significant increase in blood biochemical parameters of liver and kidneys function and tissue oxidative stress markers along with some histopathological changes in kidney and liver tissues of experimental rats and high level of genotoxicity. Administration of *F. ulmaria* and *F. hexapetala* extracts at three different concentrations (100, 200 and 400 mg/kg/day) for 10 days resulted in a reduction of oxidative stress in tissues and decrease of serum parameters. Moreover, tested extracts attenuated the genotoxicity of cisplatin.

The results obtained as a part of the comprehensive experimental work on this PhD thesis suggest that the extracts of both tested medicinal plants are quite rich in phenolic compounds which are known for their variety of biological activities. The extracts potentially could be functional food ingredients, or used as dietetic and pharmaceutical supplements considering their good antioxidant and antimicrobial activities, and stability in different conditions. The observed results of *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of *F. ulmaria* and *F. hexapetala* extracts provide support of the traditional use of these plants in the treatment of different inflammatory conditions. Further investigation of the anti-inflammatory compounds, which are present in these plants, could reveal the mechanism of anti-inflammatory action of the investigated extracts. The extracts of selected plants from genus *Filipendula*, rich in polyphenolic compounds, attenuate cisplatin-induced kidney and liver oxidative stress, reduce tissue damage, and enhance the antioxidative status of experimental animals during cisplatin application. Therefore, these results suggest that *F. ulmaria* and *F. hexapetala* extracts may be used as supportive agents for the prevention and amelioration of cisplatin side effects like nephro- and hepatotoxicity, but with respect to the appropriate therapeutic dosage.

СКРАЋЕНИЦЕ

А – Ш

БХА – бутиловани хидроксианизол
ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина
ЕДТА – етилендиамин тетрасирћетна киселина
К – карагенан
н.а. – није анализирано
н.д. – није детектовано
н.е. – нове ере
НСАИЛ – нестериодни антиинфламаторни лекови
п.н.е. – пре нове ере
РНК – рибонуклеинска киселина
С.Е.М. – стандардна грешка средње вредности
С.Д. – стандардна девијација
СЗО – Светска здравствена организација
т.м. – телесна маса
УВ – ултраљубичасто
фам. – фамилија

A – Z

%R – проценат редукције оштећења ДНК
A – амрацин
ABTS – 2,2´-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат)
ACE – ангиотензин-конвертујући ензим
ADP – аденозид дифосфат
AKE – еквиваленти аскорбинске киселине
ALP – алкална фосфатазе
ALT – аланин трансаминаза
ANOVA – анализа варијансе
API – јонизација под атмосферским протиском
AST – аспартат трансаминаза
ATCC – „American Type Culture Collection“
ATP – аденозин трифосфат
BCC – Business Communication Company Inc.
BD – балонска дегенерација
BHA – бутилхидрокси анизол
BHT – бутилхидрокси толуен
C – конгестија
cAMP – циклични аденозин монофосфат
CAT – каталаза
CE – еквиваленти катехина
CE-MS – капиларна електрофореза са масеном спектрометријом
CFU – Colony Forming Unit
CN – конфлуентна некроза
COX – циклооксигеназа
CoA – коензим А
CP – цисплатина
CRE – креатинин
Cy 3-glc – цијанидин 3-гликозид
сДНК – комплементарна ДНК

D – десквамација тубуларног епителa
DAD – „Diode Array Detector“
DAHP – 7-фосфо-2-арабино хептулонска киселина
DCFS – дихлорофенолсулфонат
DMSO – диметил сулфоксид
DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DTNB – 2,2’-динитро-5,5’-дитио-дибензоева киселина
E – еритромицин
ELISA – „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“
EM – еозинофилни материјали у лумену тубула
EMA – Европска агенција за лекове
EPSP – 5-енолпирувилшикимска киселина 3-фосфат
ESI – електроспреј јонизација
F – фиброза
F – флуконазол
FBS – фетални говеђи серум
FHA – екстракт надземног дела *F. hexapetala*
FHR – екстракт корена *F. hexapetala*
FN – фокална некроза
FUA – екстракт надземног дела *F. ulmaria*
FUR – екстракт корена *F. ulmaria*
G – гална киселина
G- – Грам негативан
G+ – Грам позитиван
GA – атрофија гломерула и проширење субкапсуларних простора
GAPDH – глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа
GC-MS – гасна хроматографија са масеном спектрометријом
GKE – еквиваленти галне киселине
GLP – принципи добре лабораторијске праксе
GpG – 1,2-гуаниндеоксинуклеотид
GSH – редуковани глутатион
H – хлорамфеникол
H&E – хематоксилин и еозин
HA – хранљиви агар
HAT – „hydrogen atom transfer“ – директан пренос атома водоника
HCT-116 – хумана ћелијска линија канцера дебелог црева
HD – хидропсна дегенерација тубуларног епителa
HEPES – N-2-хидроксиетилпиператин-N-2-етан сулфонска киселина
HETE – хидроксиеикозитетраенска киселина
HHDP – хексахидроксидифенол
HPETE – хидропероксиеикозитетраенска киселина
HPLC-MS – масена спектрометрија уз течну хроматографију високих перформанси
HPTLC – танкослојна хроматографија високих перформанси
I – инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага
i.p. – интраперитонеална апликација
IASP – „International Association for the Study of Pain“
IC_{50} – концентрација која инхибира дејство слободних радикала за 50%
IE – интерстицијални едем
IFCC – „International Federation of Clinical Chemistry“
IH – интерстицијално крварење
II – зпаљенски инфилтрат у интерстицијуму
IL – интерлеукин
in silico – „на силицијуму“, компјутерски софтвери
in situ – „на лицу места“, онде где се појава догађа
in vitro – „у стаклу“, ван нормалног биолошког окружења

in vivo – „у живом“, унутар живог организма
IR спектроскопија – инфрацрвена спектроскопија
K – кверцетин
KCH – хиперплазија Купферових ћелија
Ket. – кетоконазол
KKE – еквиваленти кафеинске киселине
Kl. – клотримазол
LC-DAD-HRMS – течна хроматографија са масеном спектрометријом високе резолуције
LDH – лактат дехидрогеназа
LDL – липопротеини мале густине
LOX – липоксигеназа
LPS – липополисахаридни слој
LT – леукотриени
MDA – малондиалдехид
MDH – малат дехидрогеназа
MDR – „multidrug resistance“
MIC – минимална инхибиторна концентрација
MRC-5 – хумана ћелијска линија фибробласта плућа
MRSA – метицилин резистентни *Staphylococcus aureus*
mPHK – информациона рибонуклеинска киселина
N – некроза тубуларног епитела
N – нистатин
NAD^+- никотинамид аденин динуклеотид
NBT – нитро плаво тетразолијум
NF-κB – нуклеарни транскрипциони фактор капа Б
NMR – нуклеарна магнетна резонанца
NOS – азот оксид синтетаза
NPR/PEG – природни производи-полиетилен гликол реагенс
NTB – 2-нитро-5-меркаптобензоева киселина
O.D. – оптичка густина
p.o. – *per os,* орална апликација
PABA – *p*-аминобензоева киселина
PAF – фактор агрегације тромбоцита
PBS – „phosphate buffer saline“
per se – по себи, собом, само за себе
PG – пропил галат
PG – простагландини
PGF – простагландини растворљиви у фосфатном пуферу
PGE – простагландини растворљиви у етру
PhEur – европска фармакопеја
PMA – форбол 12-миристат 13-ацетат
PPAR – пероксизомални пролифераторно активирани рецептор
ppm – „procent per million“
Real time PCR – ланчана реакција полимеразе у реалном времену
R_f – ретенциони фактор
RNS – реактивне врсте азота
ROS – реактивне врсте кисеоника
RSS – реактивне врсте сумпора
RUE – еквиваленти рутина
RAA – релативна антиоксидативна активност
SAR – Structure-activity relationship
SDA – Sabouraud декстрозни агар
SDS – натријум додецил сулфат
SET – „single electron transfer“ – пренос једног електрона
SOD – супероксид дисмутаза

TBA – тиобарбитурна киселина
TBARS – тиобарбитурна киселина реагујуће супстанце
TBHQ – терцијарни бутилхидро-хинон
TCA – трихлор сирћетна киселина
THP-1 – ћелијска линија хумане акутне моноцитне леукемије
TLC – танкослојна хроматографија
TMC – „transition metals chelation“ – хелатизација прелазних метала
TNF-α – фактор некрозе тумора α
TP – укупни протеини
TPC – садржај укупних фенолних једињења
TX – тромбоксани
U – уреа
U251 – хумана ћелијска линија глиобластома
UA – мокраћна киселина
UDP – уридин дифосфат
UV-VIS спектроскопија – ултраљубичаста-видљива спектроскопија
XTT – натријумова со 3-[1-(фениламинокарбонил)-3,4-тетразолијум]-бис(4-метокси-6-нитро)бензен сулфонске киселине
γGT – гама глутамил трансфераза

Листа слика

			Страна
1)	Слика 1.1.	Класификација 100 једињења природног порекла у клиничком испитивању, по терапеутској области	6
2)	Слика 2.1.	Представници подфамилија које припадају фамилији Rosaceae	9
3)	Слика 2.2.	Најзаступљеније биљне врсте из рода Filipendula. 1 – Filipendula ulmaria; 2 – Filipendula hexapetala; 3 – Filipendula camtschatica; 4 – Filipendula palmata; 5 – Filipendula rubra; 6 – Filipendula stepposa	10
4)	Слика 2.3.	Илустративни приказ изгледа делова биљака Filipendula ulmaria (L.) Maxim. (лево) и Filipendula hexapetala Gilib. (десно)	12
5)	Слика 2.4.	Изглед биљке Filipendula ulmaria (L.) Maxim.	13
6)	Слика 2.5.	Хемијска формула и прво оригинално паковање аспирина	17
7)	Слика 2.6.	Изглед биљке Filipendula hexapetala Gilib.	18
8)	Слика 2.7.	Хемијске структуре фенолних киселина и њихових деривата идентификованих у биљкама из рода Filipendula	28
9)	Слика 2.8.	Основни скелет у хемијској структури флавоноида (флаванско језгро, 2-фенил-бензо[α]пиран)	28
10)	Слика 2.9.	Различите класе флавоноида значајних у људској исхрани добијене модификацијом С-прстена	29
11)	Слика 2.10.	Хемијске структуре флавоноида и флавоноидних гликозида идентификованих у биљкама из рода Filipendula	30
12)	Слика 2.11.	Флавоноидни гликозиди - деривати кверцетина идентификовани у биљкама F. ulmaria и F. hexapetala	31
13)	Слика 2.12.	Структура 1,2,3,4,6-пентагалоилглукозе	32
14)	Слика 2.13.	Хемијске структуре елагитанина идентификованих у биљкама из рода Filipendula	33
15)	Слика 2.14.	Равнотежа између реактивних врста и антиоксиданата in vivo	48
16)	Слика 2.15.	Механизми антимикробног деловања на бактеријску ћелију	55
17)	Слика 2.16.	Начин деловања и најчешће коришћени нестероидни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ)	63
18)	Слика 2.17.	Илустративни приказ грађе а) јетре, б) класичног јетриног лобулуса и в) хепатоцита	66
19)	Слика 2.18.	Илустративни приказ грађе а) бубрега, б) нефрона и в) бубрежног телашцета	69
20)	Слика 2.19.	Механизам деловања цисплатине и начини везивања за ДНК	72
21)	Слика 4.1.	Молекулска структура флавоноидног гликозида рутина (I) и његовог 1:1 комплекса са Al^{3+} јоном (II)	81
22)	Слика 4.2.	Фазе TLC хроматографске анализе: (I) наношење узорка на плочу; (II) развијање хроматограма; (III) визуализација мрља и одређивање R_f вредности	86
23)	Слика 4.3.	Протокол симулације in vitro дигестије	104
24)	Слика 4.4.	Шематски приказ NF-κB активације COX-2	113
25)	Слика 4.5.	Комплекс Cu^{2+} јона са атомима азота из пептидних веза протеина	120
26)	Слика 5.1.	TLC хроматограм метанолних екстраката надземних делова и корена биљака F. ulmaria и F. hexapetala и референтних једињења – А (NPR/PEG, VIS); Б (NPR/PEG, 365 nm)	142
27)	Слика 5.2.	HPTLC профили метанолних екстраката F. ulmaria (FUA и FUR) и F. hexapetala (FHA и FHR), као и референтних једињења (1–6)	144
28)	Слика 5.3.	HPLC профили метанолних екстраката F. ulmaria (FUA и FUR) пре (А, Б) и након хидролизе (В, Г)	146
29)	Слика 5.4.	HPLC профили метанолних екстраката F. hexapetala (FHA и FHR) пре (А, Б) и након хидролизе (В, Г)	147
30)	Слика 5.5.	LC-MS хроматограми метанолних екстраката надземног дела	152

		(FUA – плаво) и корена (FUR – црвено) биљке F. ulmaria	
31)	*Слика 5.6.*	*LC-HRMS хроматограм метанолног екстракта надземног дела биљке F. hexapetala (FHA)*	*161*
32)	*Слика 5.7.*	*LC-HRMS хроматограм метанолног екстракта корена биљке F. hexapetala (FHR)*	*162*
33)	*Слика 5.8.*	*Укупан антиоксидативни капацитет екстраката биљака F. ulmaria и F. hexapetala, изражен у еквивалентима аскорбинске киселине (mg AKE/g екстракта)*	*173*
34)	*Слика 5.9.*	*Редуктивни капацитет метанолних екстраката надземног дела и корена биљака F. ulmaria (FUA, FUR) и F. hexapetala (FHA, FHR) у поређењу са референтним антиоксидантима природног и синтетичког порекла*	*176*
35)	*Слика 5.10.*	*Промене у липидној оксидацији тј. нивоу TBARS у месо модел системима којима су додати FUA и FUR екстракти (А), FHA и FHR екстракти (Б) у различитим концентрацијама у временском интервалу од 14 дана*	*180*
36)	*Слика 5.11.*	*pH стабилност (А, Б), термална стабилност (В, Г) и стабилност у току in vitro дигестије (Д, Ђ) метанолних екстраката F. ulmaria (FUA и FUR) праћена преко садржаја укупних фенолних једињења и DPPH методе*	*182*
37)	*Слика 5.12.*	*pH стабилност (А, Б), термална стабилност (В, Г) и стабилност у току in vitro дигестије (Д, Ђ) метанолних екстраката F. hexapetala (FHA и FHR) праћена преко садржаја укупних фенолних једињења и DPPH методе*	*184*
38)	*Слика 5.13.*	*Проценат метаболички активних ћелија код HCT-116, U251 и MRC-5 ћелијских линија третираних екстрактима F. ulmaria (А), екстрактима F. hexapetala (Б), цисплатином (В) и винбластином (Г) у различитим концентрацијама*	*191*
39)	*Слика 5.14.*	*Проценат повећања едема у односу на време протекло од изазивања едема код експерименталних животиња третираних екстрактима F. ulmaria (А) и F. hexapetala (Б) у поређењу са јединственим вредностима негативне (само карагенан) и позитивне контроле (индометацин и карагенан)*	*199*
40)	*Слика 5.15.*	*Утицај екстраката F. ulmaria на параметре оксидативног стреса у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана: А – каталаза (CAT), Б – супероксид дисмутаза (SOD), В – редуковани глутатион (GSH) и Г – параметри липидне пероксидације (TBARS)*	*207*
41)	*Слика 5.16.*	*Утицај екстраката F. hexapetala на параметре оксидативног стреса у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана: А – каталаза (CAT), Б – супероксид дисмутаза (SOD), В – редуковани глутатион (GSH) и Г – параметри липидне пероксидације (TBARS)*	*208*
42)	*Слика 5.17.*	*Репрезентативне фотографије ткивних препарата бубрега пацова третираних екстрактима F. ulmaria и CP*	*213*
43)	*Слика 5.18.*	*Репрезентативне фотографије ткивних препарата јетри пацова третираних екстрактима F. ulmaria и CP*	*214*
44)	*Слика 5.19.*	*Репрезентативне фотографије ткивних препарата бубрега пацова третираних екстрактима F. hexapetala и CP*	*217*
45)	*Слика 5.20.*	*Репрезентативне фотографије ткивних препарата јетри пацова третираних екстрактима F. hexapetala и CP*	*218*

Листа схема

			Страна
1)	*Схема 2.1.*	*Синтеза шикимске киселине – почетак шикиматног циклуса*	*35*
2)	*Схема 2.2.*	*Синтеза пентагалоилглукозе, телимаграндина II и елагинске киселине*	*36*
3)	*Схема 2.3.*	*Синтеза хоризминске киселине и њене реакције – „тачка гранања“*	*38*
4)	*Схема 2.4.*	*Биосинтеза фенилаланина и тирозина и добијање циметних киселина*	*39*
5)	*Схема 2.5*	*Биосинтеза салицилне киселине, метил салицилата и салицина*	*40*
6)	*Схема 2.6.*	*Хидролиза гаултерина*	*41*
7)	*Схема 2.7.*	*Биосинтеза флавоноида, флавона, флавонола, антоцијанидина и катехина*	*42*
8)	*Схема 2.8.*	*Преглед реакција које воде формирању реактивних врста кисеоника (ROS)*	*46*
9)	*Схема 2.9.*	*Неопходне структурне карактеристике флавоноида и механизам директног „хватања“слободних радикала (кверцетин)*	*51*
10)	*Схема 2.10.*	*Механизми (HAT, SET и TMC) антиоксидативне активности полифенола*	*52*
11)	*Схема 2.11.*	*Прооксидативна активност флавоноида*	*53*
12)	*Схема 2.12.*	*Метаболизам арахидонске киселине и синтеза простагландина (PG), тромбоксана (TX) и леукотриена (LT)*	*60*
13)	*Схема 4.1.*	*Облици мономерних антоцијана у киселој pH средини као основа pH диференцијалне методе одређивања (на pH мањим од 3 црвене боје, на pH 4-5 безбојни)*	*84*
14)	*Схема 4.2.*	*Реакција антиоксиданта (RH) са 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикалом*	*92*
15)	*Схема 4.3.*	*Добијање $ABTS^{+\cdot}$ оксидацијом ABTS-а са калијум персулфатом и његова реакција са антиоксидантом (RH)*	*93*
16)	*Схема 4.4.*	*Реакција супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) са NBT-ом и антиоксидантом (RH)*	*94*
17)	*Схема 4.5.*	*Механизам модификоване Griess-ове реакције*	*95*
18)	*Схема 4.6.*	*Редукција плавог индикатора ресазурина, у присуству ензима дехидрогеназа у живој бактеријској ћелији, до ресоруфина розе боје*	*107*
19)	*Схема 4.7.*	*Редукција жуто обојеног XTT до наранџастог XTT-формазана, у присуству митохондријалних дехидрогеназа*	*109*
20)	*Схема 4.8.*	*Реакција трансаминације аланина катализована аланин трансаминазом (ALT)*	*122*
21)	*Схема 4.9.*	*Реакција настајања лактата из пирувата катализована лактат дехидрогеназом (LDH)*	*122*
22)	*Схема 4.10.*	*Реакција трансаминације аспарагинске киселине катализована аспартат трансаминазом (AST)*	*122*
23)	*Схема 4.11.*	*Реакција настајања малата из оксалацетата катализована малат дехидрогеназом (MDH)*	*123*
24)	*Схема 4.12.*	*Реакција настајања p-нитрофенола из p-нитрофенилфосфата катализована алкалном фосфатазом (ALP)*	*124*
25)	*Схема 4.13.*	*Реакција настајања 5-амино-2-нитробензоеве киселине из L-γ-глутамил-3 карбокси-p-нитроанилида катализована гама-глутамил трансферазом(γ-GT)*	*125*
26)	*Схема 4.14.*	*Спрегнуте реакције за одређивање концентрације урее*	*126*
27)	*Схема 4.15.*	*Реакција креатинина и пикринске киселине у базној средини, при чему настаје Јановски комплекс*	*127*

28)	*Схема 4.16.*	*Спрегнуте реакције за одређивање концентрације мокраћне киселине*	*128*
29)	*Схема 4.17.*	*Аутооксидација епинефрина и настајање супероксидног анјона (O_2^-)као главног супстрата за SOD*	*132*
30)	*Схема 4.18.*	*Реакција редукованог глутатиона (GSH) са DTNB, при чему настаје 2-нитро-5-меркаптобензоева киселина*	*133*
31)	*Схема 4.19.*	*Реакција малондиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (TBA)*	*135*

Листа табела

			Страна
1)	Табела 1.1.	Неки од најважнијих природних производа изолованих из биљака који су одобрени у фармакотерапији	5
2)	Табела 2.1.	Поређење инфрагеничких система у роду Filipendula	11
3)	Табела 2.2.	Фенолна једињења идентификована у биљкама рода Filipendula	21
4)	Табела 2.3.	Реактивне врсте кисеоника, азота и сумпора	47
5)	Табела 4.1.	Масе (g) и приноси (w/w) сувих екстраката надземних делова (хербе са цвасти) и корена биљака F. ulmaria и F. hexapetala	79
6)	Табела 4.2.	Врсте микроорганизама коришћене за испитивање антимикробне активности	105
7)	Табела 4.3.	Третмани експерименталних животиња за испитивање антиноцицептивне активности	116
8)	Табела 4.4.	Третмани експерименталних животиња за испитивање нефро- и хепатопротективне активности екстраката F. ulmaria (FUA и FUR) и F. hexapetala (FHA и FHR)	119
9)	Табела 5.1.	Садржај укупних фенолних једињења и појединих група фенолних једињења у метанолним екстрактима биљака F. ulmaria и F. hexapetala	141
10)	Табела 5.2.	Фенолна једињења (mg/g) квантификована HPLC методом у метанолним екстрактима надземног дела и корена биљака F. ulmaria и F. hexapetala пре и након хидролизе	149
11)	Табела 5.3.	Фенолна једињења идентификована у екстрактима F. ulmaria (FUA и FUR) помоћу LC-DAD-MS^n анализе. Пикови су идентификовани поређењем са референтним једињењима или базирано на коришћењу литературних података	153
12)	Табела 5.4.	Једињења идентификована помоћу LC-DAD-HRMS анализе у екстрактима F. hexapetala (FHA и FHR). Пикови су идентификовани поређењем са аутентичним референтним једињењима или базирано на коришћењу литературних података	163
13)	Табела 5.5.	Антиоксидативна активност метанолних екстраката биљака F. ulmaria и F. hexapetala и стандардних антиоксиданата на нивоу неутрализације $DPPH^{\cdot}$, $ABTS^{+\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$ и $NO^{\cdot}$ радикала и капацитета хелатације	175
14)	Табела 5.6.	Инхибиција липидне пероксидације екстраката биљака F. ulmaria и F. hexapetala и стандардних антиоксиданата у различитим модел системима	178
15)	Табела 5.7.	Антибактеријска активност екстраката биљака F. ulmaria (FUA, FUR) и F. hexapetala (FHA, FHR), у поређењу са чистим фенолним једињењима (гална киселина и кверцетин) и референтним антибиотицима (амрацин, еритромицин и хлорамфеникол)	187
16)	Табела 5.8.	Антифунгална активност екстраката биљака F. ulmaria (FUA, FUR) и F. hexapetala (FHA, FHR), у поређењу са чистим фенолним једињењима (гална киселина и кверцетин) и референтним антимикотицима (нистатин, флуконазол, кетоконазол и клотримазол)	189
17)	Табела 5.9.	Цитотоксична активност екстраката F. ulmaria и F. hexapetala и стандардних једињења (цисплатина и винбластин) тестирана на три ћелијске линије (U251, HCT-116 и MRC-5) и изражена преко IC_{50} вредности (μg/mL)	192
18)	Табела 5.10.	In vitro антиинфламаторна активност екстраката биљака F. ulmaria и F. hexapetala и стандардних компоненти, изражена у	194

процентима инхибиције (%) ензимске активности и експресије гена

19) *Табела 5.11.* *Резултати испитивања антиноцицептивне активности екстраката F. ulmaria и F. hexapetala у две различите дозе (100 и 200 mg/kg т.м.) на експерименталне животиње у тесту вруће плоче, у односу на негативну контролу и индометацин (10 mg/kg т.м.)* *195*

20) *Табела 5.12.* *Резултати испитивања антиедематозног потенцијала екстраката F. ulmaria и F. hexapetala у две различите дозе (100 и 200 mg/kg т.м.) на експерименталне животиње, у односу на позитивну контролу и индометацин (10 mg/kg т.м.)* *197*

21) *Табела 5.13.* *Телесна маса, тежински однос бубрега и јетре у односу на телесну масу (т.м.) пацова третираних екстрактима биљке F. ulmaria (FUA и FUR) и цисплатином (CP) и ефекат третмана на биохемијске параметре серума пацова* *203*

22) *Табела 5.14.* *Ефекат екстраката биљке F. hexapetala (FHA и FHR) и цисплатине (CP) на телесну масу, тежински однос јетре и бубрега у односу на телесну масу (т.м.) пацова и биохемијске параметре серума пацова* *204*

23) *Табела 5.15.* *Ефекти екстраката F. ulmaria на морфолошке параметре у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана (n = 5)* *212*

24) *Табела 5.16.* *Ефекти екстраката F. hexapetala на морфолошке параметре у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана (n = 5)* *216*

25) *Табела 5.17.* *Генотоксични и антигенотоксични ефекти метанолних екстраката биљке F. ulmaria (FUA и FUR) у бубрезима и јетри пацова третираних цисплатином* *221*

26) *Табела 5.18.* *Генотоксични и антигенотоксични ефекти метанолних екстраката биљке F. hexapetala (FHA и FHR) у бубрезима и јетри пацова третираних цисплатином* *222*

Увод

1

Примена лековитих биљака у традиционалној (народној) медицини за лечење разних обољења је универзална и већ столећима не јењава.[1–4] Под појмом лековити биљни производи или „фитопрепарати“ подразумевају се биљке, делови биљака или биљни екстракти, који су у употреби у здравственој заштити, за превенцију или лечење одређених болести.[2] Постоји тренд коришћења лековитих биљака у савременој медицини, што се дешава управо у времену када је медицина постала изузетно развијена, пре свега у технолошком смислу, што подразумева развитак опреме и производа који се користе за дијагностику и третман обољењâ, али и у научном смислу, где је дошло до огромног напретка у дизајну и испитивању механизама који доводе до настанка и развитка болести.[1]

Од давнина људи су се ослањали на природу и њене изворе како би задовољили своје основне потребе, пре свега за храном, али исто тако не мање значајне потребе за лековима за широк спектар болести. Питање које се намеће јесте: *На који начин се у давна времена могла утврдити лековитост одређене биљне врсте?* Одговор је врло једноставан: *емпиријским сазнањима*. У почетку је то био људски нагон за самоодржањем, а потом пажљиво посматрање природе и употреба оних биљних врста за које је искуством потврђено да су корисне, како за животиње, тако и за човека. Историјски гледано, све до XVI века биљке су представљале основ лечења и превенције различитих обољења.[1,4–8] Многе биљне врсте које поседују лековита својства користиле су се вековима само на ограниченој територији, у одређеном делу Земљине кугле, али путовања и миргације становништва резултирали су тиме да су се многе од њих почеле користити, а и сада се користе широм света.[1,2,7,9,10] Употреба лековитог биља довела је до формирања сложеног система традиционалне медицине, са најстаријим записима о медицинској примени биљака на сумерским глиненим плочама датираним око 2600. године п.н.е. (Месопотамија), где је побројано око 12 рецепата за израду лекова и помиње се преко 250 биљних врста. Многе од поменутих биљака су и данас у употреби у сврху лечења запаљења, прехлада и инфекција, нпр. уље кедра (*Cedrus spp*.) и чемпреса (*Cupressus sempevirens*), сладић (*Glycyrrhiza glabra*) и мира (*Commiphora myrrha*). Сматра се да египатска медицина датира још од 2900. године п.н.е., а најпознатији писани медицински документ је тзв. „Еберсов папирус“ сачињен око 1550. године п.н.е. у Теби, у коме се документује преко 700 лекова, већином биљног порекла. Што се Азијског континента тиче, традиционална кинеска медицина је опсежно документована хиљадама година (почевши од 1100 године п.н.е. и кинеске „*Materia Medica*“), а такође и индијски Ајурведа систем лечења (већ од 1000 године п.н.е.), а касније су развијени Кампо медицина у Јапану (VII век) и Унани медицина (XI век) на просторима Средњег Истока и Јужне Азије.[4–7,10–13] Сви ови видови традиционалне медицине су и даље у употреби код већине домаћег становништва.

Грци и Римљани су значајно допринели развоју рационалног коришћења биљних лекова у древном западном свету. Диоскорид (*Pedanios Dioskorides*), грчки лекар и апотекар, током својих путовања са римским армијама широм тада познатог света, у делу „Наука о лековима у пет књига“ (*лат. De Materia medica libri quinque*, 77.

година н.е.) описао је начин сакупљања, чувања и коришћења лековитих биљака. Гален (*Claudius Galenus,* 129–200. године н.е.), римски лекар и филозоф грчког порекла, био је добро познат по својим сложеним прописима и рецептима које се користе у справљању лекова и сагледавању фармакологије кроз теоријски и емпиристички приступ. Он је, такође, био аутор првог пописа лековитих биљака или биљних делова (дрога) које имају исти или сличан терапијски ефекат. [5,9–11,14]

У Средњем веку (V-XII век), а нарочито у мрачном делу раног средњег века, једино је монаштво западноевропских манастира сачувало знања западне медицине, док су Арапи, поред очувања грчко-римских знања, додатно развили и унапредили сопствене ресурсе, заједно са кинеским и индијским лековитим биљкама још увек непознатим грчко-римском свету.[7,9–11] Проналазак Гутенбергове штампарије довео је до поновног интересовања за грчко-римска знања у XV и XVI веку и израде неколико веома утицајних књига о биљкама које су широко распрострањене у Европи.[7] За све то време, лековито биље је примењивано само на емпиријском нивоу, без механистичких сазнања о њиховој фармаколошкој активности или дефинисања активних принципа. Тек је Парацелзус (*Theophrastus von Hohenheim,* 1493–1541. год.), алхемичар, лекар и филозоф, почео да доводи у питање доктрине ранијег учења, захтевајући познавање активног састојка у прописаним лековима, одбацујући средњевековне микстуре непознатог састава. Његовим инсистирањем на увођењу лекова познатог хемијског састава у терапију започело је хемијско проучавање лековитих биљака, што је свакако утицало на развој науке у XVII и XVIII веку. Поред тога, и алхемијска учења су помогла систематисању биљака, иако је праву систематику поставио тек 1735. године шведски ботаничар Карл фон Лине (*Carl Linnaeus*).[1,14] Европска фармакотерапија се током XVIII и XIX века развила захваљујући открићу Америке и пута за Индију и доношењу сазнања о до тада непознатим врстама лековитог биља и биљних дрога.[5,7]

Као и други, и наш народ је био упознат са лековитим својствима многих биљака, од којих су многе поред лечења имале и ритуалну намену, посебно босиљак (*Ocimum basilicum*).[5] Средњевековна српска медицина развијала се под утицајем византијске и западноевропске медицине. У готово свим регионима насељеним српским становништвом коришћени су медицински приручници у којима су биле описане болести тог доба и начини њиховог лечења, а најстарији писани подаци о средњевековној српској медицини сабрани су у Ходошком зборнику (1390. година). У овом делу побројано је око 90 рецепата који указују да је терапија лековитим биљкама била главни и често једини облик третмана.[15] Међутим, највреднији извор српске средњевековне народне медицине је Хиландарски медицински кодекс (XV-XVI век) у коме је описано преко 100 биљних врста и дрога биљног порекла, а чије се писање ослањало на Диоскоридову западноевропску фармакотерапију. Поред Ходошког зборника и Хиландарског кодекса, многа дела настала су при манастирским болницама, јер су то била једина места где је било организовано лечење српског становништва у доба турске власти и сва она су у својој основи имала фитотерапију.[5,15]

Тек је почетком XIX века, изоловањем морфина из опијума, у Европи започета нова ера откривања лековитих супстанци из биљака. То је довело до испитивања

многих биљних врста, а током наредних деценија XIX века, из природних извора изоловани су многи биолошки активни природни производи, пре свега алкалоиди. Потом су предузети бројни напори како би се природни производи добијали хемијском синтезом, а тиме и олакшала производња, побољшао квалитет производа и смањили трошкови.[7] Салицилна киселина је била прво природно једињење добијено хемијском синтезом 1853. године. Након изоловања пеницилина и Другог светског рата, отпочео је научни и финансијски развој модерне фармацеутске индустрије, при чему је масовно започета замена биљних екстраката и делимично пречишћених природних производа са једињењима која поседују одређену фармаколошку активност.[7,16]

Од тада лекови базирани на природним производима дају изузетан допринос здравственој заштити. Светска здравствена организација (СЗО) је крајем XX века проценила да се око 65-80% светског становништва ослања на традиционалне лекове биљног порекла у примарној здравственој заштити, што је посебно изражено у земљама у развоју.[9,11,13,17] Може се чак и рећи да разлог велике употребе лекова традиционалне медицине лежи у томе што синтетички лекови, због великих трошкова производње, нису довољно приступачни ширем становништву.[3,17] Тако да је употреба лекова традиционалне медицине увелико препоручена од стране СЗО Пекиншком декларацијом из 2008. године.[18] Упркос томе што је у последњих неколико деценија примат у фармацеутској индустрији ипак преузела синтетичка хемија, и даље је јако велики број нових лекова базиран на природним производима који потичу већином из биљних извора. Природни производи такође дају и структурне основе за синтезу нових једињења мале молекулске масе са потенцијалном биолошком активношћу.[9,19–21] Са економског аспекта, на основу извештаја BCC компаније (*енг.* „Business Communication Company“, Inc.) из 2013. године, глобално тржиште биљних лекова је 2011. године процењено је на 21,4 милијарду долара, а до 2017. очекује се да ће достићи вредност 26.6 милијарди.[4] Ови подаци јасно показују да је интерес за лекове и дијететске производе биљног порекла и даље на изузетно високом нивоу.

Основни циљеви изоловања активних принципа из биљака су: идентификација активних супстанци; анализа биолошких ефеката (фармакодинамика) индивидуалних састојака и њихова судбина у организму (фармакокинетика); обезбеђивање прецизне и константне дозе у терапеутске сврхе; могућност хемијске синтезе која би обезбедила независност од ограничених природних ресурса; и коначно, синтезом деривата фитоједињења могу се оптимизовати фармаколошке особине истих и добити производи са значајно побољшаном терапеутском ефикасношћу.[14]

Досадашња испитивања лековитих биљака као потенцијалних лекова довела су до изоловања и карактерисања многих биоактивних једињења, од којих су нека већ увелико укључена у терапије и лечења различитих обољења. Нека од њих су побројана у *Табели 1.1.* и, као што се може видети, спектар болести на које ова једињења делују је изузетно велики.

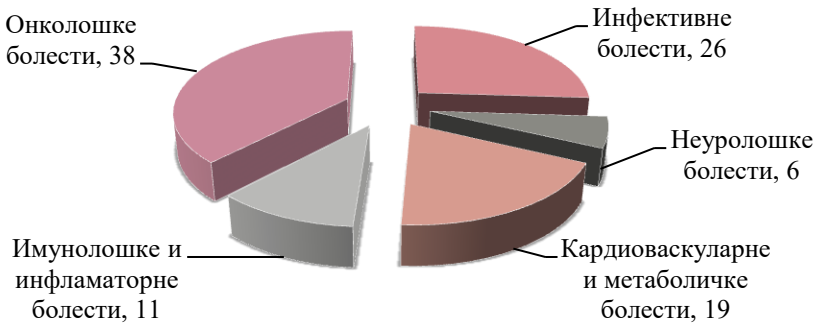
Табела 1.1. Неки од најважнијих природних производа изолованих из биљака који су одобрени у фармакотерапији [7,10,11,20–24]

Природни производ	*Биљна врста*	*Комерцијални назив и година*	*Употреба*
Артемисинин	*Artemisia annua* L.	Artemisin (1987.)	Маларија
Мазопрокол	*Larrea tridentata* (DC.) Coville	Aktinex (1992.)	Хемиотерапија канцера
Паклитаксел	*Taxus brevifolia* L.	Taxol (1993.)	Онкологија
Арглабин	*Artemisia glabella* Kar. & Kir замењено са *A. obtusiloba* var. *glabra* Ledeb.	Arglabin (1999.)	Хемиотерапија канцера
Галантамин	*Galanthus caucasicus* (Baker) Grossh.	Razadyne (2001.)	Деменција у Алцхајмеровој болести
Дронабинол/ Канабидол	*Cannabis sativa* L.	Sativex (2005.)	Хронични неуропатски болови
Винбластин и винкристин	*Catharanthus roseus* L.	Velban (2010.)	Хемиотерапија канцера
Капсаицин	*Capsicum spp.*	Zucapsaicin (2010.)	Болови
Колхицин	*Colchicum spp.*	Qutenza (2010.)	Гихт
Флоризин	*Malus domestica* Borkh.	Dapagliflozin (2012.)	Дијабетес типа II
Ингенол мебутат	*Euphorbia peplus* L.	Picato (2012.)	Актинске кератозе
Хомохарингтонин	*Cephalotaxus harringtonia*	Synribo (2012.)	Онкологија

Преко 100 хемијских ентитета изолованих из биљака је тренутно у фази предклиничког развоја и клиничких испитивања.[19,25] Посебно су интересантна једињења фенолног типа, као што су куркумин, епихалокатехин-3-*O*-галат, генистеин, кверцетин и ресвератрол.[7] Од поменутог броја једињења природног порекла највећи број (*Слика 1.1.*) се тестира у онколошке сврхе (38.38%), за терапију различитих типова канцера, потом у третманима различитих инфективних болести (26.26%), али и за кардиоваскуларна и обољења настала услед метаболичких поремећаја (19%).[19,24,25] Како је до сада фармаколошки испитано тек око 10% биљних врста, сигурно је да још много корисних биоактивних једињења чека своје откриће.[7,9]

Насупрот једнокомпонентним терапеутицима, постоји растући интерес за могућност развоја врло сложених производа који садрже јасно дефинисане мешавине биљних екстраката или чистих једињења из биљака које су у употреби у традиционалној медицини.[4,19] Фитотерапија, као научна дисциплина, базира се на развијању стратегије коришћења једног или комбинација више екстраката, који садрже широк спектар биолошки активних једињења, а чијом се употребом у људском организму активирају првенствено заштитни процеси и процеси самоизлечења, пре него да се ди-

ректно уништавају штетни агенси. Употреба оваквих фитопрепарата базира се на терапеутским искуствима и увреженом становишту да се комбинацијом ниских доза неколико компонената или одговарајућих екстраката може много ефикасније утицати на комплексне физиолошке процесе са врло мало или без нежељених ефеката, пре него високом дозом једне изоловане компоненте.[1–3,26]



Слика 1.1. Класификација 100 једињења природног порекла у клиничком испитивању, по терапеутској области. Подаци из Butler et al. (2014).[25]

Како би се фитопрепарати могли користити у превенцији и третману обољења потребно је посебну пажњу усмерити на одређивање квалитета, безбедности и ефикасности биљног производа.[2,13,27,28] Стога, од стране СЗО и Европске агенције за лекове, успостављен је знатан број смерница и регулаторних система који утврђују стандарде за одређивање особина, производњу и употребу биљних лекова.[4] Контрола квалитета фитомедикамената постиже се испитивањем различитих особина биљног материјала, првенствено ботаничких (идентификација), потом биолошких, физичких и органолептичких особина, али круцијално је испитивање хемијских карактеристика тј. хемијског састава.[1–3,7,13,23] Квалитативна и квантитативна анализа секундарних метаболита у биљним екстрактима, односно стандардизација екстраката, је изузетно комплексна и захтевна, али је у последње време знатно олакшана захваљујући развијању високо сензитивних и репродуцибилних аналитичких метода које се могу применити самостално или у комбинацији са класичним техникама (танкослојна хроматографија – TLC и HPTLC, ултраљубичаста-видљива спектроскопија – UV-VIS, инфрацрвена спектроскопија – IR и нуклеарна магнетна резонанца – NMR, масена спектрометрија уз течну хроматографију високих перформанси – HPLC-MS, гасну хроматографију – GC-MS, HPLC-NMR, капиларну електрофорезу – CE-MS, или уз различите технике јонизације – јонизација под атмосферским притиском (API) или електроспреј јонизација (ESI).[7,9,13,29–31] Следећи кораци за одређивање ефикасности фитопрепарата подразумевају испитивање спектра фармаколошких активности у *in vitro* и *in vivo* условима, синергистичких ефеката конституената препарата, механизама деловања, а потом и контролисане клиничке студије уз фармакокинетичка и фармакодинамичка испитивања.[3,13]

Врло честа појава која је примећена код проучавања фитомедикамената јесте да биљни екстракти испољавају очекивану биолошку активност, али након изоловања

одређених фракција активност се значајно смањује или губи у потпуности. Дакле, екстракт нема одређени активни принцип на коме почива терапијска примена. То се може објаснити постојањем *синергизма* тј. синергистичких интеракција између компонената у самом екстракту, док оне појединачно имају јако слаб биолошки потенцијал. Ове интеракције могу довести не само до терапијског деловања биљног екстракта, већ и до смањења нежељених ефеката и токсичности истог.[1,17] Друга значајна појава јесте *поливалентност* мултикомпонентних фитопрепарата, која се дефинише као спектар биолошких активности које екстракт може испољити, а што доприноси укупном ефекту посматраном клинички или у *in vivo* условима.[2] Иако се ова два појма у пракси мешају, јасно је да се синергизам односи искључиво на једну фармаколошку активност, док поливалентност обухвата низ активности које резултирају свеукупним терапеутским ефектом. Стога, уколико екстракт или смеша екстраката показују ове особине, непходно је испитивање њихових активности вршити коришћењем већег броја биолошких метода како би се добили што репрезентативнији подаци о њиховој активности.[1,2]

Иако је још увек доминантно мишљење да употребу фитопрепарата треба ограничити на превенцију и лечење умерених обољења, многа клиничка испитивања су показала да неки фитопрепарати могу бити примењивани уместо синтетичких лекова, и да чак и имају идентичан интензитет терапеутске ефикасности.[3] Такође, показало се да стандардизовани фитопрепарати, као што су екстракти надземног дела ехинацее (*Echinacea purpurea herba recens*)[32], корена жен-шена (*Panax ginseng radix*)[33] или листа гинка (*Ginkgo biloba* L. *folium*)[34] могу бити самостално коришћени у терапијске сврхе уз испољавање изузетне фармаколошке активности. Узимајући у обзир резултате многих мултидисциплинарних научних студија можемо констатовати да фитотерапија, заснована на рационалним научним доказима, може бити врло ефикасно укључена у савремену медицину. Томе додатно може допринети утицај развоја нових технологија у области хемије, медицине и фармације, као и сарадње различито профилисаних истраживача на пројектима који за циљ имају развој нових методологија и начина примене фитопрепарата.[35] Синтеза наночестица, микрокапсула, фитозома или липозома, који садрже биљне екстракте или фитојединења, знатно је допринела постизању оптималне биолошке активности *in vivo*.[36–38] Неки од савремених приступа проучавању природних производа којима се све више прибегава су тзв. „виртуални скрининг“ софтвери који користе постојеће библиотеке једињења како би се тестирала *in silico*, са циљем откривања селективности и специфичне фармаколошке активности.[7,18] Огроман подстицај за непрестано развијање истраживања лековитих биљака јесте и чињеница да је део Нобелове награде у области физиологије 2015. године припао кинеској научници проф. др Јују Ту (Youyou Tu) за откриће, изоловање и развој антималарика артемисинина, природног производа из биљке слатки пелин (*Artemisia annua* L.).[39] Све наведене чињенице, досадашњи напредак фитохемије и фитотерапије, као и изузетни резултати на мултидисциплинарном научном пољу, дају подстрек за нова истраживања којима би се дошло до нових биолошки активних фитотерапеутика или једињења биљног порекла и њиховог даљег развоја.

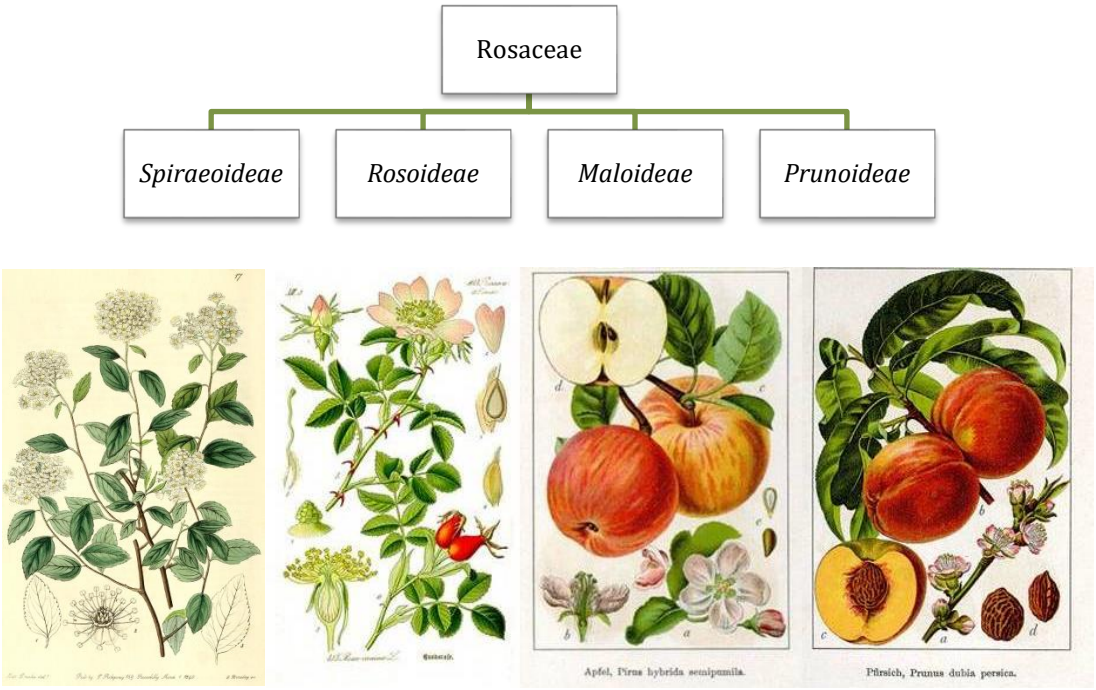
Општи део

2

2.1. Опште карактеристике, традиционална употреба и фармаколошко дејство одабраних врста рода *Filipendula* Mill. (Rosaceae)

Фамилија ружа (Rosaceae) је једна од врстама најбогатијих и географски најраспрострањенијих фамилија биљака. Она обухвата 4 подфамилије и то: *Spiraeoideae, Rosoideae, Maloideae* и *Prunoideae* (*Слика 2.1.*). Око 3000-4000 биљних врста припадају овој породици, које су распоређене у више од 100 родова.[1,40]

Фамилија Rosaceae је по величини тј. по броју биљних врста које обухвата на деветнаестом месту. Родови који су најобимнији по броју врста које обухватају су *Alchemilla, Sorbus, Crataegus, Cotoneaster*, *Rubus* и *Prunus*, сваки са 200, па чак и преко 250 врста.[41] Ову фамилију чине, по многим карактеристикама, веома разноврсне биљке. Њихову разноликост можемо уочити на различитим нивоима почев од животне форме (присутне су зељасте вишегодишње, ређе једногодишње биљке, жбунови, шибље и дрвеће), па до распрострањености.[40,42]



Слика 2.1. Представници подфамилија које припадају фамилији Rosaceae [i]

Хемијска једињења која се налазе у саставу већине биљака из ове породице су цијанидни гликозиди, сапонини, танини, липиди (у семенкама), шећерни алкохоли и терпеноиди; док су алкалоиди и кумарини јако ретки. Секундарни метаболити ове фамилије су основа бројних испитивања у хемотаксономији.[1] Велики број биљака које при-падају фамилији Rosaceae коришћене су од давнина у традиционалној медицини многих народа. Њихова велика распрострањеност и доступност становништву допринели су да ове биљне врсте буду саставни део великог броја чајних мешавина; цветови,

листови, корен и плодови коришћени су, а и даље се користе за лечење разних обољења.[43]

Род *Filipendula* Mill. (фамилија Rosaceae, подфамилија Rosoideae) обухвата око 20 врста биљака које су предоминантно распрострањене у умереном и субарктичком подручју тј. у северној хемисфери. Биљака овог рода има у Европи, Северној Америци, Сибиру и Азији.[44] Сам назив рода потиче од две латинске речи: *filium* што значи нит или конац и *pendulus* што би значило висећи, а односи се на корен неких врста који чине ризоми повезани танким нитима.[45] У прошлом веку род *Filipendula* Mill. био је предмет проучавања многих научних истраживања, при чему је највећа дискусија вођена око дефинисања подродова који чине овај род. На крају је род подељен на основу морфолошких и географских података на четири категорије: *Hypogyna*, *Schalameya*, *Albicoma* и *Filipendula* (*Табела 2.1.*).[46,47]

У евроазијском флорном елементу најзаступљеније врсте из рода *Filipendula* су *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, а поред њих присутне су још неке биљне врсте, али у знатно мањој мери и на ограниченој територији.[40,48,49] На *Слици 2.2.* приказане су биљне врсте које су најкарактеристичнији и најзаступљенији представници овог рода.

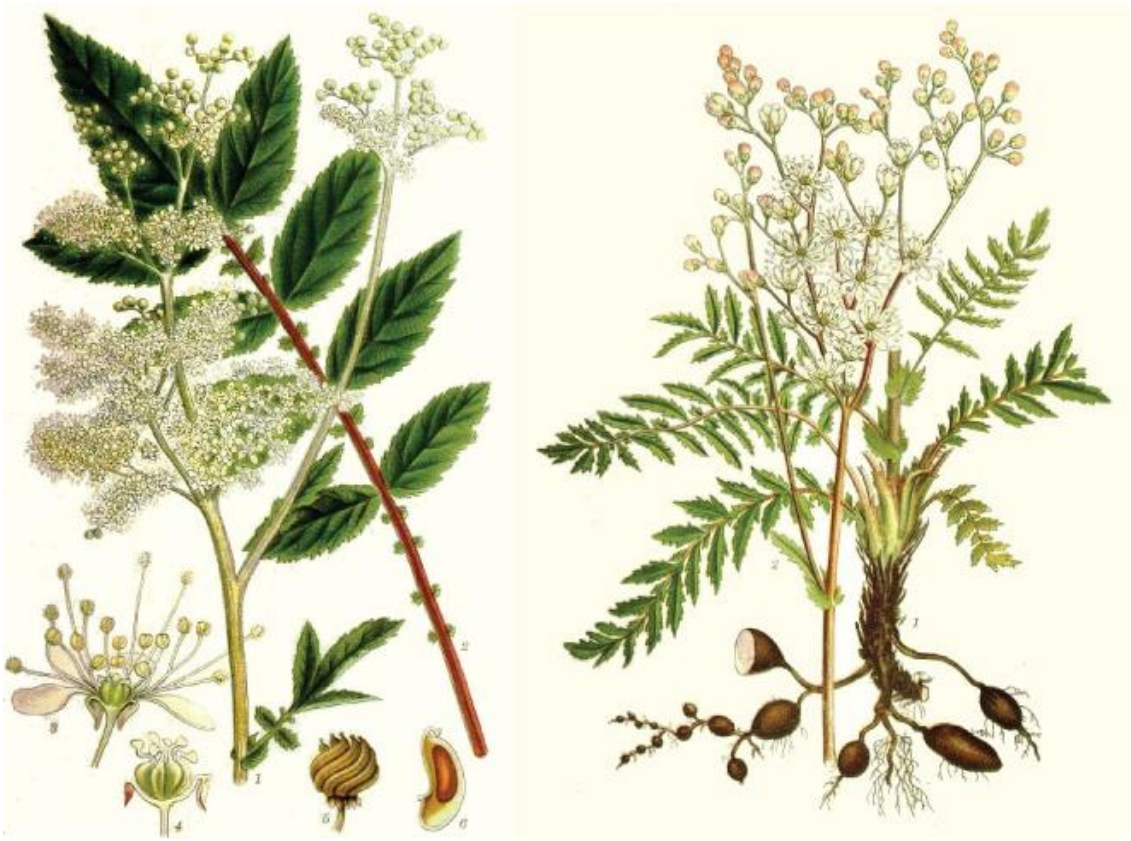


Слика 2.2. Најзаступљеније биљне врсте из рода Filipendula. 1 – Filipendula ulmaria; 2 – Filipendula hexapetala; 3 – Filipendula camtschatica; 4 – Filipendula palmata; 5 – Filipendula rubra; 6 – Filipendula stepposa [ii]

Табела 2.1. Поређење инфрагенеричких система у роду Filipendula. Подаци из Schanzer (1994)[46] *и Lee et al. (2009)*[47]

Juzepczuk (1941)	Shimizu (1961)	Sergievskaya (1967)	Schanzer (1994)
	Subgen. *Hypogyna* T. Shimizu 1. *F. occidentalis* (S. Watson) Howell	**Subgen. *Hypogyna* T. Shimizu** 1. *F. occidentalis* (S. Watson) Howell	**Sect. *Hypogyna* (T. Shimizu) Shantser** 1. *F. occidentalis* (S. Watson) Howell
Subgen. *Aceraria* Juz.	**Subgen. *Ulmaria* Moench**	**Subgen. *Aceraria* Juz.**	
Sect. *Schalameya* Juz. 1. *F. kamtschatica* Maxim. 2. *F. glabra* Nakai ex Kom. & Aliss. 3. *F. purpurea* Maxim. 4. *F. palmata* (Pall.) Maxim.	**Sect. *Schalameya* Juz.** 2. *F. kamtschatica* Maxim. 3. *F. glaberrima* Nakai 4. *F. yezoensis* Hara 5. *F. purpurea* Maxim. 6. *F. multijuga* Maxim. 7. *F. palmata* (Pall.) Maxim. 8. *F. rubra* (Hill) B. L. Rob.	**Sect. *Aceraria* Serg.** 2. *F. kamtschatica* Maxim. 3. *F. koreana* Nakai 4. *F. auriculata* (Ohwi) Kitam. 5. *F. glaberrima* Nakai 6. *F. vestita* (Wall.) Maxim. 7. *F. palmata* (Pall.) Maxim. 8. *F. purpurea* Maxim.	**Sect. *Schalameya* Juz.** 2. *F. kamtschatica* Maxim. 3. *F. glaberrima* Nakai 4. *F. formosa* Nakai 5. *F. multijuga* Maxim. 6. *F. tsuguwoi* Ohwi 7. *F. kiraishiensis* Hayata
Sect. *Albicoma* Juz. 5. *F. angustiloba* (Turcz.) Maxim. 6. *F. intermedia* (Glehn) Juz.	**Sect. *Albicoma* Juz.** 9. *F. angustiloba* (Turcz.) Maxim.	**Sect. *Albicoma* Juz.** 9. *F. angustiloba* (Turcz.) Maxim. 10. *F. intermedia* (Glehn) Juz. 11. *F. rubra* (Hill) B. L. Rob.	**Sect. *Albicoma* Juz.** 8. *F. angustiloba* (Turcz.) Maxim. 9. *F. palmata* (Pall.) Maxim. 10. *F. rubra* (Hill) B. L. Rob.
	Sect. *Sessilia* T. Shumizu 10. *F. vestita* (Wall.) Maxim. 11. *F. kiraishiensis* Hayata 12. *F. formosa* Nakai 13. *F. tsuguwoi* Ohwi	**Sect. *Gymnocarpa* Serg.** 12. *F. kiraishiensis* Hayata 13. *F. formosa* Nakai 14. *F. tsuguwoi* Ohwi 15. *F. multijuga* Maxim.	
Subgen. *Ulmaria* Moench 7. *F. ulmaria* (L.) Maxim. 8. *F. denudata* (J. Presl & C. Presl) Fritsch 9. *F. stepposa* Juz. 10. *F. megalocarpa* Juz.	**Sect. *Ulmaria* Hill** 14. *F. ulmaria* (L.) Maxim.	**Subgen. *Ulmaria* Moench** 16. *F. ulmaria* (L.) Maxim. 17. *F. denudate* (J. & C. Prest) Fritsch. 18. *F. stepposa* Juz. 19. *F. megalocarpa* Juz.	**Sect. *Filipendula*** 11. *F. vestita* (Wall.) Maxim. 12. *F. ulmaria* (L.) Maxim. 13. *F. stepposa* Juz. 14. *F. megalocarpa* Juz.
Subgen. *Eu-Filipendula* Juz. 11. *F. hexapetala* Gilib.	**Subgen. *Filipendula*** 15. *F. hexapetala* Gilib.	**Subgen. *Filipendula*** 20. *F. hexapetala* Gilib.	15. ***F. vulgaris*** Hill (=*F. hexapetala* Gilib.)

Род *Filipendula* на подручју Србије, као и на читавом Европском континенту, представљају две врсте, и то: *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (синоним *Spiraea ulmaria* L.) и *Filipendula hexapetala* Gilib. (синоними *Filipendula vulgaris* Moench., *Spiraea filipendula* L.).[40,48,50] Заједничке морфолошке особине ове две врсте јесу да су то вишегодишње зељасте биљке са ризомом (*Слика 2.3.*) чији листови су испрекидано перасто дељени или перасти, ређе режњевити, а залисци су велики и срасли са лисним дршкама. Цветови су им двополни, са 5 до 6 чашичних листића и исто толико крунични листића који су беле, ружичасте или пурпурне боје. Плодићи су кожасти, не отварају се и једносемени су, слободни или сабијени.[40]



Слика 2.3. Илустративни приказ изгледа делова биљака Filipendula ulmaria (L.) Maxim. (лево) и Filipendula hexapetala Gilib. (десно) [iii]

2.1.1. Filipendula ulmaria (L.) Maxim. – *медуника*

Filipendula ulmaria (L.) Maxim. у нашем народу је најпознатија под називом *медуника*, али су присутни и други називи као што су свињурак, мочварна суручица, будитељица, осинка (*Слика 2.4.*). То је вишегодишња биљка, висока је 50 до 200 cm, са водоравним, одрвенелим ризомом, при чему су адвентивни корени ризома кончасти. Стабљика је усправна, чврста, угласта, у горњем делу граната, са много листова који су

испрекидано перасти, крути, са 2-5 пари листића. Листићи су са горње стране голи, тамнозелени, а са доње светлозелени или прекривени белим длачицама. Цваст је дугачка 5 до 25 cm, богата цветовима. Круничних листића најчешће има 5 до 6 и дугачки су 2-5 mm, округластог облика, жућкасто-беличасте боје и имају јак, сладак мирис. Плод је дужине око 2 mm, го, смеђ и спирално увијен.[40]

F. ulmaria расте на влажним местима, око бара, потока и јаркова, на влажним и мочварним ливадама, на ободима и унутар мезофилних шума, често у веома великој количини на једном месту. Распрострањена је у Европи и Азији и припада евроазијском флорном елементу.[40,51–55] Постоје две подврсте, и то *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *ssp. ulmaria* и *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *ssp. denudata*.[40] Назив *ulmaria* значи „слично бресту“, иако сама биљка уопште нема сличности са брестом (*Ulmus*).[56]



Слика 2.4. Изглед биљке Filipendula ulmaria (L.) Maxim. [iv]

Медуника има веома дугу историју коришћења у сврху лечења, посебно међу европским народима. Употреба биљке *F. ulmaria* у традиционалној медицини забележена је још крајем XVI и у XVII веку, иако се сматра да датира много раније.[53,57,58] Поред симболичне и естетске вредности белих цветова медунике, они су били сматрани и као моћни састојци за справљање лековитих препарата. Уопштено, у сврхе лечења коришћени су сви делови биљке, не само цвет, већ и лист и корен, и то првенствено у терапији различитих запаљенских процеса, неуралгија, за испирање очију и као диуретици.[57–61] Током година примећено је да медуника олакшава реуматске болове, па употреба ове биљке прелази од диуретичне ка антиреуматској.[58,62] У нашем народу најчешће се за третман реуматизма користио чај справљан од свих делова медунике који се ставе у кључалу воду, а затим се препарат остави преко ноћи и пије наредни дан, пре доручка.[48] Важно је напоменути да се употреба медунике за

ублажавање болова може пратити уназад кроз време, све до 1597. године.[62] Аналгетичка својства медунике су такође позната.[53,63–66]

У народној медицини користе се чајеви, инфузи и тинктуре, приправљани од свих делова биљке, и то у терапији различитих типова обољења: реуматизма, едема, гихта и нефритиса, као адстрингенси, благи аналгетици. Ту се пре свега мисли на антиинфламаторне и антиреуматске особине, аналгетички ефекат, диуретичко и дијафоретичко дејство.[51,54,58,62–64,67–72] На основу побројаних особина, посебно због антизапаљенског потенцијала, деловања као дијафоретик (антипиретик) и диуретик (због садржаја велике количине салицилата), медуника је изузетно ефикасна у терапији грипа и упале плућа. Такође се користила за побољшање крвне слике, јер салицилна једињења помажу код излучивања зноја (дијафоретички ефекат), а тако и свих штетних супстанци из организма.[40,53,54,63]

Медуника се користи код многих гастроинтестиналних обољења где олакшава мучнину, у третману хиперацидитета, горушице, гастритиса и пептичког чира, за који је један од најефикаснијих биљних лекова, јер салицилати које биљка садржи не утичу на епително ткиво желуца и црева.[53,62,64,66,73] Такође, као диуретик побољшава рад бубрега[53] и користи се као састојак чајних мешавина за снижавање телесне тежине.[74,75] Биљка је драгоцен лек у третману дијареје, нарочито се користи у лечењу дијареје код деце, а има употребу и за лечење инфекција уринарног тракта.[63,64,71,76,77] Адстрингентно дејство медунике је искоришћено за приправу препарата који се користе спољa, за зарастање рана и лечење чирева.[52,61,62,65,78] У народној медицини медуника се користила и као природни лек против беснила.[40,79] То средство из искуства традиционалне употребе потврдила је и савремена медицина. Као лек против последица беснила жваће се више пута дневно, 3 до 4 дана, ситно изрезани свеж корен.[40]

Поред употребе у традиционалној медицини, осушени листови медунике коришћени су да дају арому прехрамбеним производима и као заслађивачи за биљне чајеве.[62,64] У XVIII и XIX веку био надалеко чувен „швајцарски чај“ припреман од мешавине алпског биља, међу којима се налазила и медуника.[80] Цела биљка поседује пријатан мирис и укус, а надземни делови и цветови имају ароматичан мирис сличан горком бадему, па се због тога биљка користила и за освежавање ваздуха у просторијама, затим да дâ специфичну арому вину, пиву и сирћету. Осушени цветови често су коршћени као зачин у скандинавским варијантама медовине. Цветови се могу додати при прављењу компота од воћа и џемова, при чему им дају суптилан укус бадема. Стари Келти користили су ову биљку за добијање боје, црна је добијена из корена, коришћењем листова производио се плави пигмент, а жута боја се добијала из цветних врхова. Етарско уље добијено из цветних пупољака се користило у парфи-меријама.[56]

Последњих година је у жижу научно-истраживачких интересовања доспело анализирање хемијског састава екстраката *F. ulmaria* (надземног дела, корена, само листова или само цветова) и етарског уља добијеног из цветова ове биљке. Тако је од 2004. године објављено више од 15 научних радова различитих истраживачких група

који су се дотакли ове тематике (не рачунајући научне радове проистекле из ове докторске дисертације).[49,51,52,54,58,62–64,66,67,70,81–87]

Фитохемијски састав медунике (*F. ulmaria*) карактерише се присуством фенолних једињења од којих су најзначајнији салицилна киселина и њени деривати (салицил алдехид, метил салицилат, бензил салицилат), присутни нарочито у етарском уљу, флавоноиди и флавоноидни гликозиди (кверцетин, спиреозид, хиперозид) и танини (најприсутнији су ругозини и телимаграндини). Поред побројаних група једињења, ова биљка садржи и поликарбоксилне киселине, неке масне киселине, витамин Ц и трагове кумарина.[51,58,73,81] О овој теми ће бити нешто више речи у наредном поглављу, али је од велике важности поменути фитохемијски аспект како би се схватио значај научно потврђене биолошке активности биљке *F. ulmaria*.

Истраживања су показала да екстракти ове биљке имају широк спектар фармаколошких активности. Најпре, потврђена је *in vitro*[51,60,61,70,84,87–90] и *in vivo*[91,92] антиоксидативна активност екстраката цвета и хербе медунике. Затим, екстракти ове биљке испољили су антимикробно деловање што је потврђено у неколико студија.[63,89,93–95] Коришћење медунике у третману гастроинтестиналних обољења оправдано је резултатима испитивања деловања екстраката *F. ulmaria* на *Helicobacter pylori* и *Campylobacter jejuni* где су резултати показали добру антибактеријску активност.[96,97] Такође, екстракт хербе *F. ulmaria* има способност да инхибира активност панкреасне липазе и тако смањује апсорпцију липида, а самим тим и могућност повећања телесне тежине.[98] Vasiliauskas *et al.* (2004)[73] потврдили су позитиван терапеутски ефекат тинктуре медунике у случају желудачних тегоба изазваних антиинфламаторним лековима.

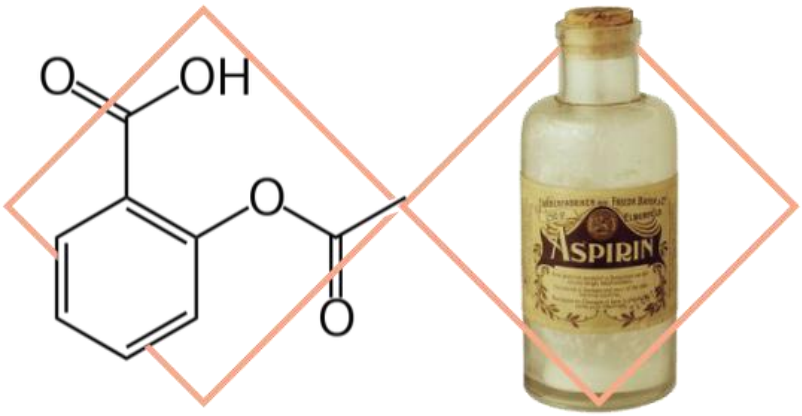
Поред тога што *F. ulmaria* ублажава тегобе настале коришћењем лекова за запаљенске процесе, она има још једну терапеутску улогу на основу својих антиинфламаторних особина. Научна истраживања, која су се до сада углавном фокусирала на *in vitro* студије, потврдила су антиинфламаторни потенцијал етанолних и водених екстраката *F. ulmaria*. Још 1995. Tunón *et al.*[79] открили су да листови *F. ulmaria* врше инхибицију биосинтезе простагландина и PAF–индуковану егзоцитозу. Две године касније, Halkes *et al.*[57,69] испитали су имуномодулаторну активност корена, хербе и цвета *F. ulmaria* и утврдили да екстракти инхибирају комплементарну активацију и пролиферацију Т-ћелија и да интерферирају са реактивним кисеоничним врстама (ROS) и њиховом продукцијом. Још један од могућих механизама антиинфламаторног деловања ове биљне врсте је инхибиција ензимске активности 15-липоксигеназе[60], еластазе[71] или хистидин декарбоксилазе[64]. Drummond и сарадници спровели су *in vitro*[99] и *in vivo*[100] истраживања антиинфламаторне активности *F. ulmaria* при чему су дошли до закључка да екстракт смањује продукцију инфламаторних цитокина IL-1*β*, IL-6 и TNF-α. Скорије су Vogl *et al.* (2013)[76] потврдили да екстракт хербе активира 50-75% PPAR протеин рецепторе (PPAR-α и PPAR-γ) и инхибира NF-κB.

Надземни део *F. ulmaria* поседује и потенцијални антихипертензивни ефекат јер инхибира активност ангиотензин-конвертујућег ензима (ACE I).[101] Цитотоксичност *F. ulmaria* је испитивана у више студија, при чему је извесна активност уочена на

ћелијској линији мишјег меланома B16[60], хуманим лимфобластоидним ћелијама[102] и на ћелијама канцера плућа (NCI-H460)[53]. Екстракти *F. ulmaria* су испољили и високу заштиту ДНК, тј. антигенотоксичност.[91,103] Анксиолитичку активност екстраката и фракција *F. ulmaria* потврдило је неколико истраживачких група.[55,104] Етанолни екстракт *F. ulmaria* инхибирао је ензиме везане за Алцхајмерову и Паркинсонову болест (ацетилхолин естеразу и тирозиназу).[70] Такође, екстракт и фракције *F. ulmaria* имали су хепатопротективну активност *in vivo* при интоксикацији угљен-тетрахлоридом.[92,105] Испитана је и доказана антикоагулативна активност екстракта *F. ulmaria in vitro* и *in vivo*.[106] Одскора је једна истраживачка група развила и стандардизовала таблете које садрже екстракт *F. ulmaria,* а оне се препоручују за употребу као ноотропни, адаптогени, антиоксидативни, хепатопротективни и имунотропни агенси.[107] Због свих наведених особина ове биљне врсте, проучавани су многи начини примене у прехрамбене сврхе, па је тако испитивана примена водених екстраката као додатака прехрамбеним производима[68] и антимикробно деловање биофилма испуњеног екстрактом медунике у заштити јабука.[108]

На основу традиционалне употребе и доказаних фармаколошких ефеката, херба (надземни део) медунике је регистрована у Петој европској фармакопеји (PhEur 5.0) као *Filipendulae ulmariae herba*[62], а сада је саставни део најновијег деветог издања европске фармакопеје (PhEur 9.0) из 2017. године. Такође, херба и цвет *F. ulmaria* регистровани су у Европској агенцији за лекове (EMA).[106]

Још једна, могло би се рећи, занимљивост везана за медунику јесте да је на основу њеног ранијег латинског назива (*Spirea ulmaria*) добио име највише коришћен лек данашњице, Аспирин®. Године 1899. немачки истраживач Феликс Хофман (Felix Hoffmann) је, уз сугестију свог надређеног, др Артура Ајхенгрина (Arthur Eichengrün) у лабораторијама немачке компаније „Freidrich Bayer & Co.“ синтетисао ацетилован дериват салицилне киселине, ацетилсалицилну киселину. За салицилате се знало да имају антиинфламаторне особине, као и то да испољавају неке негативне ефекте у гастроинтестиналном тракту. Стога је од изузетног значаја била синтеза једињења које не показује тако изражене нежељене ефекте. Након многих научних превирања (о чему се више може сазнати у публикацији Parojčić, 2003[109]) доказано је да тај синтетички производ изазива мање дигестивних проблема од чисте салицилне киселине. Нови лек, ацетилсалицилну киселину, Хофманов и Ајхенгринов послодавац Бајер патентирао је под називом *„аспирин“*, где је префикс „а“ од ацетат, „спир“ потиче од латинског назива за медунику, *Spiraea ulmaria,* или од немачког назива за киселину „*Spirsäure*“-спирична киселина добијену из салицил алдехида изолованог из ове биљке, а „ин“ је био уобичајени завршетак назива за лекове тог времена (*Слика 2.5.*). Аспирин је коришћен, а и данас се користи у великим размерама, као аналгетик, антиреуматик, има антиинфламаторни ефекат и спречава агрегацију тромбоцита.[62,109,110]



Слика 2.5. Хемијска формула и прво оригинално паковање аспирина [v]

Многи извори тврде да главно фармаколошко дејство *F. ulmaria* испољава захваљујући присуству разних испарљивих и неиспарљивих салицилата. Хидролизом агликона и гликозида у дигестивном систему добија се салицилна киселина, која је носилац фармаколошке активности.[62] За разлику од чистог аспирина, за који је доказано да у високим дозама, као и салицилати, може изазвати желудачне улцерације, комбинација састојака у самој биљци *F. ulmaria* штити унутрашњу слузокожу желуца и црева, док истовремено испољава антиинфламаторно дејство. Ипак, ову биљку не би требало да користе људи који су преосетљиви на аспирин, нарочито они који болују од астме.[78]

2.1.2. Filipendula hexapetala Gilib. – *суручица*

За биљну врсту *Filipendula hexapetala* Gilib. у народу се најчешће користи назив *суручица*, мада постоје и други називи као што су: гомољаста суручица, грижељ, грипељ, дивљи грашак, кончара, ломикамен, пасја рута, сирутарка, суручарка или филипенда. То је вишегодишња биљка, висока 30 до 80 cm, са прилично танким, чворноватим, косим ризомом (*Слика 2.6.*). Поседује адвентивне корене ризома (допунски коренови који полазе из стабла, а не из клице) који су са дугуљасто вретенастим до скоро лоптастим кртолама. Стабљика је једноставна, ретко у горњем делу граната, танка, округласта или слабо избраздана, са јако размакнутим листовима, усправна или ретко устајућа, гола. Листови су испрекидано перасти, имају 8 до 25 пари већих и дужих листића. Између већих листића има један пар сасвим малих, дугуљастих, перасто режњевитих или често перасто назубљени листова. Цветови су шесточлани, прилично велики, жућкасто-беле боје, споља бледоружичасти. Плодићи су дугачки 3 до 4 mm, са кратким длакама, седећи и нису спирално увијени. *F. hexapetala* се може наћи по сувим до прилично влажним травним местима и ређе по сувим, проређеним шумама. Ова биљка се може наћи у Европи, Сибиру, Кавказу, Малој Азији и припада суббореалном флорном елементу.[40,111–113]

Као што је случај са медуником (*F. ulmaria*), и суручица (*F. hexapetala*) има велику примену у традиционалној медицини европских народа, нарочито на Балканском полуострву.[113–117] У употреби су сви делови биљке, дакле цвет, херба, корен (ризом), као и цела биљка, у облику чајева, инфуза, тоника, и то због свог антиинфламаторног, антипиретичког, аналгетичког, диуретичког, дијафоретичког и антиреуматског дејства.[50,112,116–119] Само на основу наведених особина суручице може се повући паралела са подацима наведеним за употребу медунике у народној медицини и закључити да ове биљке из истог рода имају сличне биолошке активности и да се аналогно користе у третману истих или сличних обољења.



Слика 2.6. Изглед биљке Filipendula hexapetala Gilib. [vi]

Чај од надземног дела суручице користи се у терапији реуматизма, гихта, разних инфекција и грознице.[76] Такође се чај суручице у нашем народу користи за снижавање крвног притиска.[48] Уситњен гомољасти корен користи се у облику декокта за лечење проблема са бубрезима, отежаног дисања и упале грла.[116] Како ризом суручице има висок садржај танина, често се користи за ублажавање болова у стомаку и дијареје.[116,117,119] Антихеморагичне (зауставља крварење) и астрингентне особине цвета и корена суручице омогућиле су њену примену у третману хемороида.[50,112,116,120] У употреби је и чај од листа за чишћење рана и испирање очију[116], а цветови се користе у облику инфуза у третману екцема и због свог емолиентног (хидрирајућег), антиастматичног и антидизентеричног дејства.[113]

Досадашња изучавања фитохемијског састава биљке *F. hexapetala* установила су присуство неколико група фенолних једињења у биљним органима. Као и када се говорило о класама фенолних једињења идентификованих у *F. ulmaria,* и у *F. hexapetala* је потврђено присуство истих, и то присуство фенолних киселина (укључу-

јући салицилну киселину и њене деривате), флавоноида и њихових деривата, танина (посебно у корену), витамина Ц, неких полисахарида и трагова кумарина.[112,119,121–123]

Фармаколошка активност биљке *F. hexapetala* није толико детаљно изучавана, у поређењу са *F. ulmaria*, али доступни подаци указују на чињеницу да ова биљка може имати значајан терапеутски потенцијал. У малом броју научно-истраживачких студија изучавани су етарско уље и екстракти различитих делова суручице и потврђена је њихова *in vitro* антиоксидативна активност[113,118,119,123], антимикробни ефекти[116,124] и цитотоксичност.[102] Поред тога, започето је *in vitro* испитивање антиинфламаторне активности у условима, где је екстракт цвета *F. hexapetala* показао добре резултате у смањењу експресије IL-8 и E-селектин mРНК.[76] Метанолни екстракт цвета *F. hexapetala* испољио је протективни ефекат код оштећења јетре индукованог угљен-тетрахлоридом *in vivo*.[120] Екстракти и различите фракције *F. hexapetala* испољили су утицај на централни нервни систем, па је тако на експерименталним животињама потврђен њихов анксиолитички[125] и ноотропни ефекат.[126,127]

На основу презентованих података и литературних извора може се уочити да постоји много више података о употреби медунике (*F. ulmaria*) кроз векове него што је то случај са суручицом (*F. hexapetala*). Разлог вероватно лежи у чињеници да су по изгледу и по особинама ове две биљке јако сличне па се у народу није правила велика разлика између њих. Такође, у многим литературним подацима се описује употреба једне од њих, а за другу се само наглашава да је начин употребе идентичан.[50] У многим случајевима чак долази и до погрешака при навођењу латинске номенклатуре и народних назива, па лако може доћи до забуне о којој се тачно биљној врсти говори.

2.2. Преглед најзаступљенијих секундарних метаболита биљних врста из рода *Filipendula* Mill.

Биљке производе огроман број органских једињења врло различите хемијске структуре. Многа од ових једињења су есенцијална за биљке, за њихов раст и развој, а такође их користе људи и животиње као извор неопходних нутритијената. У ову групу се убрајају различити облици C-3, C-4, C-5, C-6 шећера; полисахариди, као што су целулоза, скроб и фруктани; масне киселине и липиди; протеини, као што су ензими и компоненте које улазе у структуру ћелијских мембрана; нуклеинске киселине ДНК и РНК.[21]

Поред поменутих примарних метаболита, биљке производе и велики број једињења мале молекулске масе. Многа од ових једињења нису есенцијална за основне метаболичке процесе у биљкама и класификована су као секундарни метаболити биљака. Оваква терминологија сугерише, често нетачно, да ова једињења нису есенцијална за нормалан раст, развој или размножавање биљака, али су најчешће одговорна за нормално функционисање биљке са њеним окружењем. Многа од ових

једињења су се јављала, без сумње, током еволуције, под утицајем еколошког притиска конкуренције, укључујући борбу две биљке за светлост и простор, борбу са инсектима и другом фауном, као и борбу са разним бактеријама и гљивицама. До сада је идентификовано и хемијски окарактерисано око 50 000 хемијских једињења која припадају групи секундарних метаболита биљака, међутим, сматра се да је укупан број ових једињења у царству биљака много већи.[128] Верује се да секундарни метаболити играју кључне улоге у физиологији и екологији биљака. Биљке их продукују као одбрамбене агенсе против штеточина и патогена или као атрактанте за корисне организме, као што су инсекти опрашивачи, имају улогу алелопатских агенаса, штите од УВ зрачења, могу бити сигнални молекули, а такође неки учествују у фиксацији азота у кореновом систему неких биљака.[129,130] Због њихових биолошких активности, поједине секундарне метаболите биљака човек употребљава као лекове, стимулансе или чак отрове.[131]

Према литературним подацима екстракти и етарска уља различитих биљних врста рода *Filipendula* Mill. испољавају многе биолошке активности због присуства фенолних једињења као значајне групе секундарних метаболита ових биљака. Неке од научно потврђених биолошких активности су већ наведене: антиоксидативна, антимикробна, антиинфламаторна и хепатопротективна активност.[53,76,93,119,120,126]

Биљке из рода *Filipendula*, укључујући и две биљне врсте испитиване у овој докторској дисертацији, одликују се присуством следећих група фенолних једињења[58]:

- *Фенолне киселине*;
- *Флавоноиди и флавоноидни гликозиди*;
- *Танини*.

Велики број фенолних једињења идентификован је у екстрактима хербе, цвета, листа и корена биљних врста из рода *Filipendula* Mill. У *Табели 2.2*. фенолна једињења, до сада идентификована у биљкама из рода *Filipendula*, груписана су као прости феноли и фенолне киселине, затим флавоноиди и флавоноидни гликозиди, и танини и једињења која учествују у формирању танина.

Табела 2.2. Фенолна једињења идентификована у биљкама рода Filipendula

Групе фенолних једињења		*Фенолно једињење*	*Врста*	*Делови биљке*
Фенолне киселине и њихови деривати	*1*	Салицилна киселина	*F. ulmaria*	надземни део[68]; цвет[81]; надземни део[58]
	2	Салицил алдехид	*F. ulmaria*	надземни део, лист, цвет, стабљика[62]
	3	Метил салицилат	*F. ulmaria*	надземни део, лист, цвет, стабљика[62]
	4	Хексозид салицилне киселине	*F. ulmaria*	надземни део[58]
	5	Изосалицин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
	6	Гална киселина	*F. ulmaria*	лист, цвет[49] ; цвет[63]; цвет[81]; надземни део[58]; надземни део[70]
			F. hexapetala	лист, цвет[49]; надземни део[119]; корен[123]
			F. camtschatica	лист, цвет[49]
			F. palmata	лист, цвет[49]
			F. denudata	лист, цвет[49]
			F. stepposa	лист, цвет[49]
	7	Елагинска киселина	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; надземни део[58]; цвет[81]; надземни део[70]
			F. hexapetala	лист, цвет[49]; надземни део[119]; корен[123]
			F. camtschatica	лист, цвет[49]
			F. palmata	лист, цвет[49]
			F. denudata	лист, цвет[49]
			F. stepposa	лист, цвет[49]
	8	Кафеинска киселина	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]
			F. hexapetala	лист, цвет[49]; корен[123]
			F. palmata	лист, цвет[49]

		F. denudata	цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
9	Протокатехинска киселина	*F. ulmaria*	надземни део[58]
10	Хинска киселина	*F. ulmaria*	надземни део[58]
11	Сирингинска киселина	*F. ulmaria*	надземни део[58]
12	3-*O*-галоилхинска киселина	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
13	Хлорогенска киселина (3-*O*-кафеилхинска киселина)	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; надземни део[58]; надземни део[70]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
14	4-*O*-кафеилхинска киселина	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]
		F. camtschatica	лист[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист[49]
15	1,3-ди-*O*-кафеилхинска киселина	*F. hexapetala*	лист[49]
		F. palmata	лист[49]
		F. denudata	лист[49]
		F. stepposa	лист[49]
16	3,4-ди-*O*-кафеилхинска киселина	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	цвет[49]
17	3,4,5-три-*O*-кафеилхинска киселина	*F. ulmaria*	цвет[49]
		F. hexapetala	лист[49]
		F. camtschatica	цвет[49]
		F. palmata	цвет[49]
		F. denudata	цвет[49]
		F. stepposa	цвет[49]

Флавоноиди и флавоноидни гликозиди	*19*	(+)-Катехин	*F. ulmaria*	лист[49]; цвет[81]; надземни део[58]
			F. hexapetala	лист[49]; надземни део[119]; корен[123]
			F. camtschatica	лист[49]
			F. palmata	лист[49]
			F. denudata	лист[49]
			F. stepposa	лист[49]
	20	(-)-Епикатехин	*F. ulmaria*	лист[49] ; надземни део[58]; надземни део[70]
			F. hexapetala	лист[49]; корен[123]
			F. camtschatica	лист[49]
			F. palmata	лист[49]
			F. denudata	лист[49]
			F. stepposa	лист[49]
	21	(-)-Епигалокатехин	*F. ulmaria*	лист[49] ; надземни део[58]
			F. hexapetala	лист[49]
			F. camtschatica	лист[49]
			F. palmata	лист[49]
			F. denudata	лист[49]
			F. stepposa	лист[49]
	22	Кверцетин	*F. ulmaria*	цвет[49]; надземни део[68]; лист[82]; цвет[81]; надземни део[58]; надземни део[70]; цвет[54]
			F. hexapetala	корен[122]; корен[112]
			F. denudata	цвет[49]
	23	Хиперозид	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; цвет[81]; надземни део[58]; цвет[54]
			F. hexapetala	лист, цвет[49]; надземни део[119]; надземни део, корен[122]; корен[112]
			F. camtschatica	лист, цвет[49]
			F. palmata	лист, цвет[49]
			F. denudata	лист, цвет[49]
			F. stepposa	лист, цвет[49]
	24	Спиреозид	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; лист[82]; цвет[63]; цвет[81]; надземни део[58]; надземни део[70]; цвет[54]
			F. hexapetala	лист, цвет[49]; надземни део[119];

			корен[122]; корен[112]; цвет[118]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
25	Рутин	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; лист[82]; цвет[63]; цвет[81]; надземни део[58]; надземни део[70]; цвет[54]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]; надземни део, корен[122]; корен[112]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
26	Кверцитрин	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; лист[82]; цвет[81]; надземни део[58]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]; надземни део, корен[122]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист[49]
27	Изокверцитрин	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; надземни део[58]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]; корен[122]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
28	Нарингенин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
29	Гаултерин (монотропитин)	*F. ulmaria*	надземни део[58]
30	Миквелианин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
31	Авикуларин	*F. ulmaria*	лист[49]; надземни део[58]; цвет[54]
		F. hexapetala	лист[49]; надземни део, корен[122]
		F. palmata	лист, цвет[49]

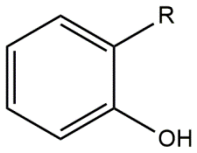
			F. denudata	лист, цвет[49]
	32	Астрагалин	*F. ulmaria*	лист[49]; цвет[81]; надземни део[58]
			F. hexapetala	надземни део[119]; корен[112]
			F. camtschatica	лист[49]
			F. palmata	лист, цвет[49]
			F. denudata	лист[49]
			F. stepposa	лист, цвет[49]
	33	Лутеолин	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]
			F. hexapetala	лист, цвет[49]; надземни део[122]; надземни део[58]; надземни део[70]
			F. camtschatica	лист, цвет[49]
			F. palmata	лист, цвет[49]
			F. denudata	лист, цвет[49]
			F. stepposa	лист, цвет[49]
	34	Лутеолин-7-глукозид	*F. hexapetala*	надземни део[119]
	35	Лутеин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
	36	Аромадендрин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
	37	Галангин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
	38	Ериодиктиол	*F. ulmaria*	надземни део[58]
	39	Кемпферол	*F. ulmaria*	цвет[49]; лист[82]; цвет[81]; надземни део[58]; цвет[54]
			F. camtschatica	цвет[49]
			F. denudata	цвет[49]
			F. stepposa	цвет[49]
	40	Кемпферол-4'-*O*-гликозид	*F. ulmaria*	лист[82]; надземни део[58]
	41	Апигенин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
	42	Куроманин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
	43	Керацијанин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
Танини	*44*	Телимаграндин I_1	*F. ulmaria*	цвет[49]; надземни део[58]
			F. hexapetala	цвет[49]
			F. camtschatica	лист, цвет[49]
			F. palmata	лист, цвет[49]

		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
45	Телимаграндин I_2	*F. ulmaria*	цвет[49]; цвет[81]; надземни део[58]
		F. hexapetala	цвет[49]
		F. camtschatica	цвет[49]
		F. palmata	цвет[49]
		F. denudata	цвет[49]
		F. stepposa	цвет[49]
46	Телимаграндин II	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; цвет[81]; надземни део[58]
		F. hexapetala	цвет[49]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
47	Ругозин A	*F. ulmaria*	надземни део[58]
48	Ругозин B_1	*F. ulmaria*	цвет[49]; цвет[81]; надземни део[58]
		F. hexapetala	цвет[49]
		F. camtschatica	цвет[49]
		F. palmata	цвет[49]
		F. denudata	цвет[49]
		F. stepposa	цвет[49]
49	Ругозин B_2	*F. ulmaria*	цвет[49]; цвет[81]; надземни део[58]
		F. hexapetala	цвет[49]
		F. camtschatica	цвет[49]
		F. palmata	цвет[49]
		F. denudata	цвет[49]
		F. stepposa	цвет[49]
50	Ругозин D	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; цвет[81]; надземни део[58]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
51	Ругозин E_1	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; цвет[81]; надземни део[58]
		F. hexapetala	цвет[49]

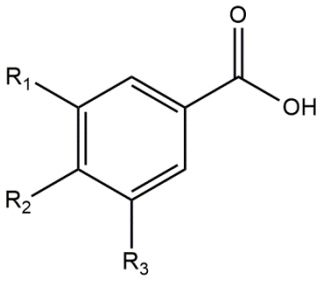
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
52	Ругозин E_2	*F. ulmaria*	лист, цвет[49]; цвет[81]; надземни део[58]
		F. hexapetala	лист, цвет[49]
		F. camtschatica	лист, цвет[49]
		F. palmata	лист, цвет[49]
		F. denudata	лист, цвет[49]
		F. stepposa	лист, цвет[49]
53	Касуаринин/касуарицитин	*F. ulmaria*	надземни део[58]
54	Моногалоил-HHDP-хексозид	*F. ulmaria*	надземни део[58]
55	Дигалоил-HHDP-хексозид	*F. ulmaria*	цвет[63]; надземни део[58]
		F. hexapetala	надземни део[119]
56	Тригалоил-HHDP-хексозид	*F. ulmaria*	цвет[63]
		F. hexapetala	надземни део[119]
57	Димер тригалоил-HHDP-хексозида	*F. hexapetala*	надземни део[119]

Прости феноли *(фенолне киселине и алдехиди, циметне киселине):* По хемијској структури то су феноли супституисани у *орто-* (*o*), *мета-* (*m*) или *пара-* (*p*) положају. Бензенов прстен фенола подлеже супституцији, при којој се добијају 1,2-, 1,3- и 1,4-супституисана једињења са минимум једном хидроксилном (OH) групом. Могућа је и супституција са три различите функционалне групе и то 1,3,5- и 1,2,6-супституција.[132,133]

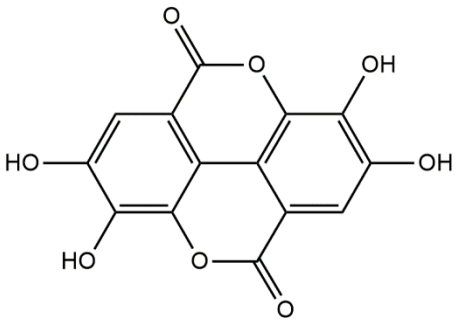
Хидроксибензоеве киселине карактеришу се присуством карбоксилне групе у молекулу фенола, а такође и циметне киселине представљају изузетно значајну групу фенолних једињења у биљкама са пропиленском групом везаном за бензенов прстен (C_6-C_3 скелет). Постоји шест најчешће присутних циметних киселина од којих свака биљна врста садржи барем три. Циметне киселине се у биљкама најчешће налазе у облику естара са хинском, шикимском или тартарном киселином. На пример, хлорогенска киселина је естар кафеинске и хинске киселине.[132,133] На *Слици 2.7.* приказане су структурне формуле фенолних киселина и њихових деривата идентификованих у биљкама из рода *Filipendula*.



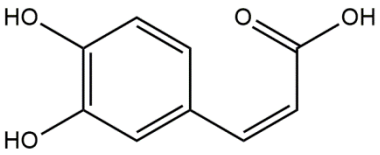
Салицилна киселина
R: -COOH
Салицил алдехид
R: -CHO
Метил салицилат
R: -COOCH3



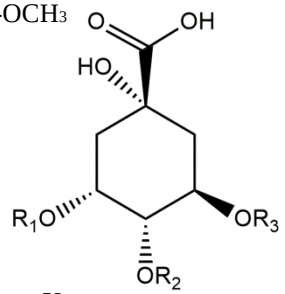
Гална киселина
R1: -OH, R2: -OH, R3: -OH
Протокатехинска киселина
R1: -H, R2: -OH, R3: -OH
Сигингинска киселина
R1: - OCH3, R2: -OH, R3: -OCH3



Елагинска киселина



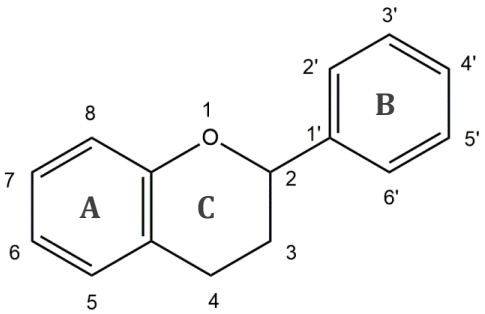
Кафеинска киселина



Хинска киселина
R1=R2=R3: -H
Хлорогенска киселина
R1: кафеил остатак, R2=R3: -H
4-*O*-кафеилхинска киселина
R2: кафеил остатак, R1=R3: -H
3,4-ди-*O*-кафеилхинска киселина
R1=R3: кафеил остатак, R2: -H
3,4,5-три-*O*-кафеилхинска киселина
R1=R2=R3: кафеил остатак

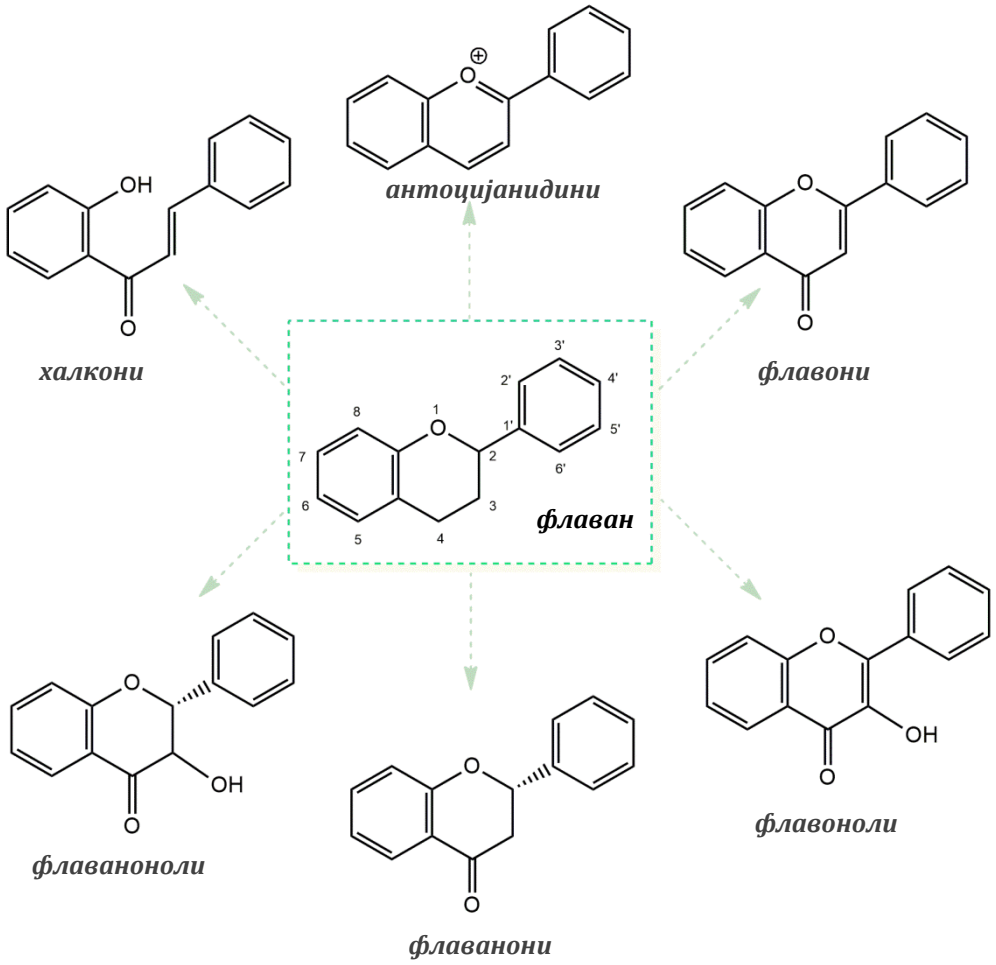
Слика 2.7. Хемијске структуре фенолних киселина и њихових деривата идентификованих у биљкама из рода Filipendula

Флавоноиди и флавоноидни гликозиди: Флавоноиди (*лат. flavus* – жуто) су полифенолна једињења чију основну хемијску структуру чини скелет од 15 угљеникових атома, распоређених у структуру C_6-C_3-C_6, односно садрже 2 бензенова прстена (А и В) и један хетероциклични прстен (С) (*Слика 2.8.*).[1,133,134]



Слика 2.8. Основни скелет у хемијској структури флавоноида (флаванско језгро, 2-фенил-бензо[α]пиран)

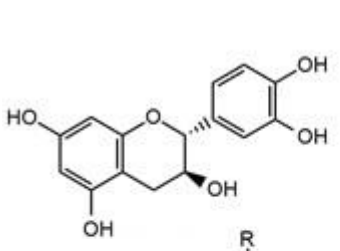
А-прстен потиче од кондензације три молекула малонил-CoA, док прстен B потиче од *p*-кумароил-CoA. Ово је уједно и објашњење зашто је А-прстен код већине флавоноида или мета-дихидроксилован или мета-трихидроксилован. Код типичних флавоноида једна мета-хидроксилна група на А-прстену учествује у формирању хетероцикличног прстена С. Прстен С може бити пиран, пирилијум или пирон. B-прстен је типично монохидроксилован, орто-дихидроксилован или трихидроксилован, а такође може имати метилетре као супституенте.[133]



Слика 2.9. Различите класе флавоноида значајних у људској исхрани добијене модификацијом С-прстена

У односу на модификације централног С-прстена, флавоноиди се могу поделити у неколико структурно различитих класа и то су: флавоноли, флавони, флаван-3-оли, флаванони, изофлавони и антоцијанидини (*Слика 2.9.*). У неким случајевима шесточлани хетероциклични прстен С јавља се у изомерном отвореном облику (халкони и дихидрохалкони) или је замењен петочланим прстеном у случају аурона. Још неке групе флавоноида које се квантитативно у мањем проценту налазе у биљкама су дихидрофлавони и флаван-3,4-диоли.[134] До сада је, бар што се тиче јестивих биљних

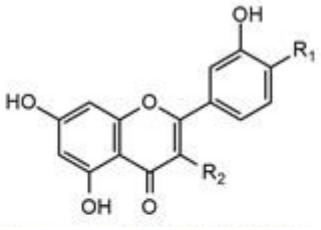
врста, окарактерисано више од 8000 различитих полифенола, који се категоришу као флавоноиди и нефлавоноидна једињења.[135] Хемијске структуре најчешће присутних флавоноида и флавоноидних гликозида у роду *Filipendula* приказане су на *Слици 2.10*.



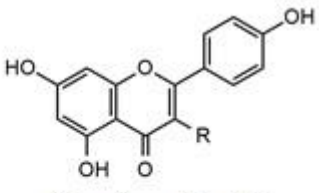
Катехин



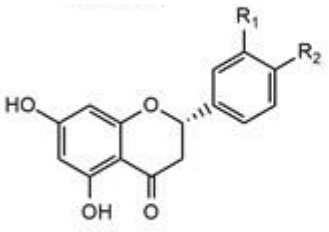
Епикатехин, R: -H
Епигалокатехин, R: -OH



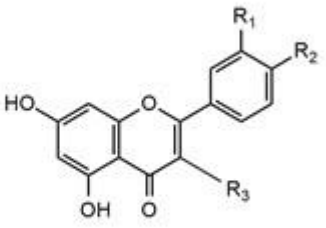
Кверцетин, R_1: -OH; , R_2: -OH
Спиреозид, R_1: -глукозид; , R_2: -OH
Рутин, R_1: -OH; , R_2: -рутинозид
Хиперозид, R_1: -OH; , R_2: -галактозид
Кверцитрин, R_1: -OH; , R_2: -рамнозид
Изокверцитрин, R_1: -OH; , R_2: -глукозид
Авикуларин, R_1: -OH; , R_2: -арабинофуранозид
Миквелианин, R_1: -OH; , R_2: -глукуронид



Кемпферол, R: -OH
Астрагалин, R: -глукозид



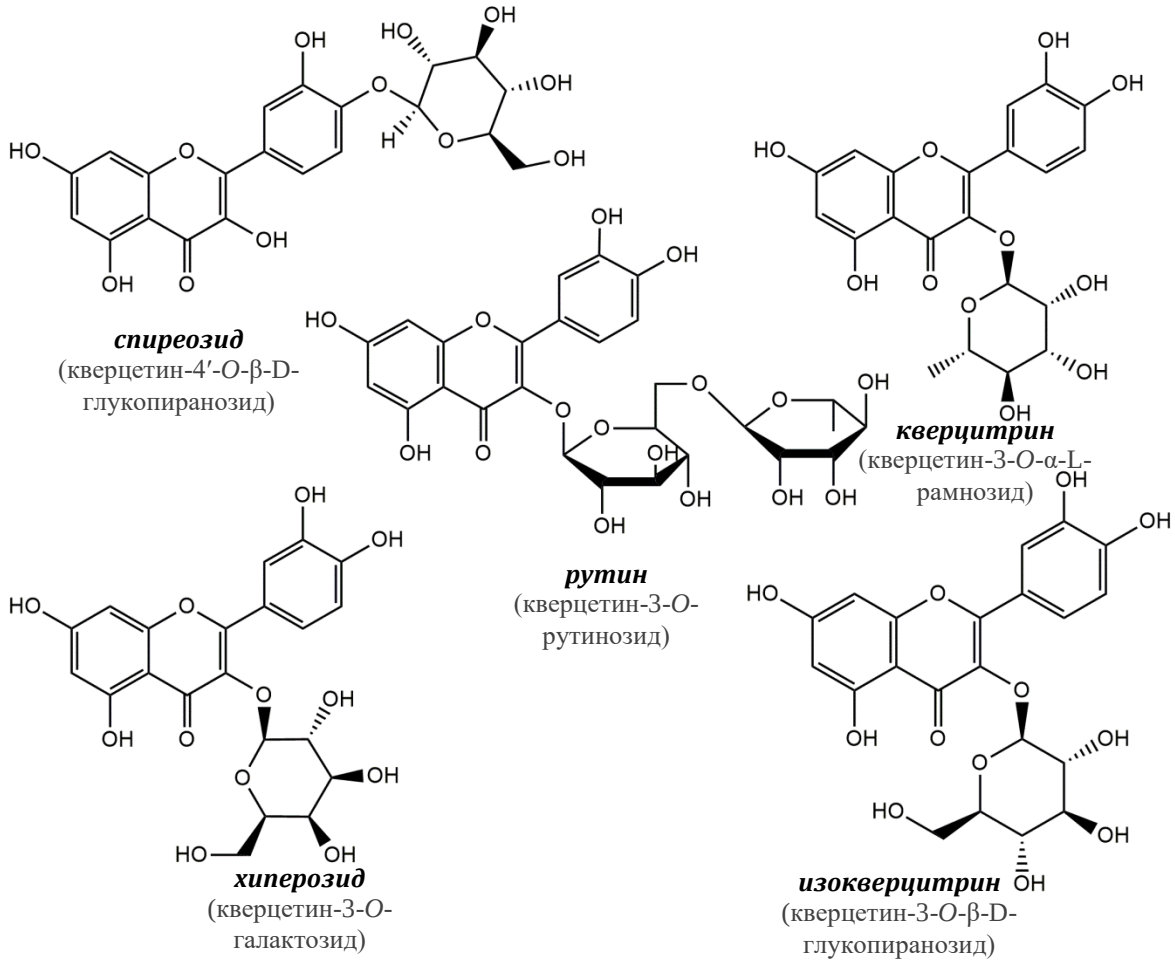
Нарингенин, R_1: -H; , R_2: -OH



Апигенин, R_1: -H; , R_2: -OH; R_3: -H
Лутеолин, R_1: -OH; , R_2: -OH; R_3: -H

Слика 2.10. Хемијске структуре флавоноида и флавоноидних гликозида идентификованих у биљкама из рода Filipendula

Посебно значајан за биљке из рода *Filipendula* је флавоноид кверцетин. Кверцетин, једно од ретких полифенолних једињења за које се може рећи да је заступљено у готово свим биљним ткивима, као и код готово свих биљних врста. Може формирати различите гликозиде, а неки као што су рутин (кверцетин-3-*O*-рутинозид), хиперозид (кверцетин-3-*O*-галактозид), кверцитрин (кверцетин-3-*O*-α-L-рамнозид) и изокверцитрин (кверцетин-3-*O*-β-D-глукопиранозид) су идентификовани у обе испитиване биљне врсте (*Слика 2.11.*).[49,81,119] Најзначајнији гликозид кверцетина који је присутан у биљкама *F. ulmaria* и *F. hexapetala* је кверцетин 4′-*O*-β-D-глукопиранозид, познат као спиреозид или спиреин. У Фармакопеји[136] спиреозид је дефинисан као референтно једињење за идентификацију и стандардизацију хербе и цвета *F. ulmaria*.



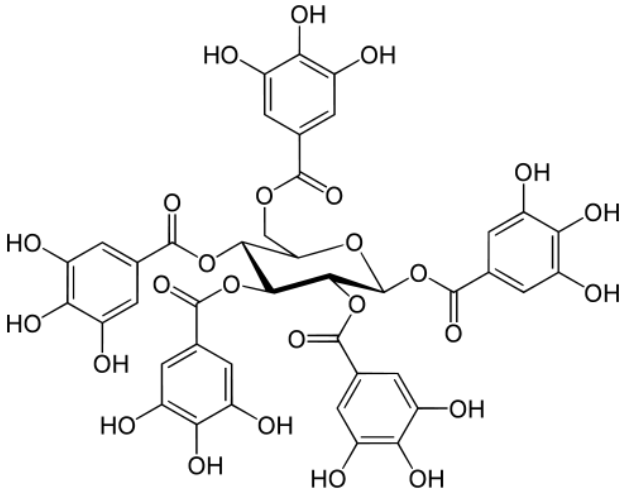
Слика 2.11. Флавоноидни гликозиди - деривати кверцетина идентификовани у биљкама F. ulmaria и F. hexapetala

Танини: То је разноврсна група једињења са великим распоном хемијских структура које имају способност да везују и таложе протеине. Сам назив танини односи се на процес штављења животињске коже (*енг.* „tanning“) за који су се у давна времена користили танини добијени из различитих биљака. Касније су они замењени различитим препаратима на бази хрома и алуминијума. Танини су коришћени у кинеској и јапанској традиционалној медицини због њихових антиинфламаторних и антисептичних особина. Танини могу бити присутни у листовима, стабљици и плодовима биљака, а основна улога им је да штите биљку од инфекција и биљоједа.[1] Танини су класификовани у три основне групе: кондензовани, хидролизабилни и сложени (комплексни) танини. Групи хидролизабилних танина припадају галотанини и елагитанини.[133,135]

Кондензовани танини, још називани и проантоцијанидини, су олигомерни и полимерни флавоноиди који се састоје од мономера флаван-3-ола (катехина). Хидролизом под екстремним условима, као што је загревање у присуству киселине, настају антоцијанидини. Полимери се формирају или деловањем киселина или ензимском катализом. Полимери који садрже 2 до 10 остатака називају се флаволани. Полимери са

више од 50 јединица катехина су такође идентификовани. Степен полимеризације утиче на способност таложења протеина.[133,134]

Галотанини су хидролизабилни танини са полихидроксилним језгром супституисаним са 10-12 остатака галне киселине. Галотанини садрже карактеристичне метадепсидне везе између остатака галне киселине. Највише заступљено полихидроксилно једињење у структури галотана је D-глукоза, иако неки галотанини садрже и јединице катехина и тритерпеноида. Галотанини са D-глукозом као централним молекулом добијени су из 1,2,3,4,6-пентагалоилглукозе (*Слика 2.12.*).[134]

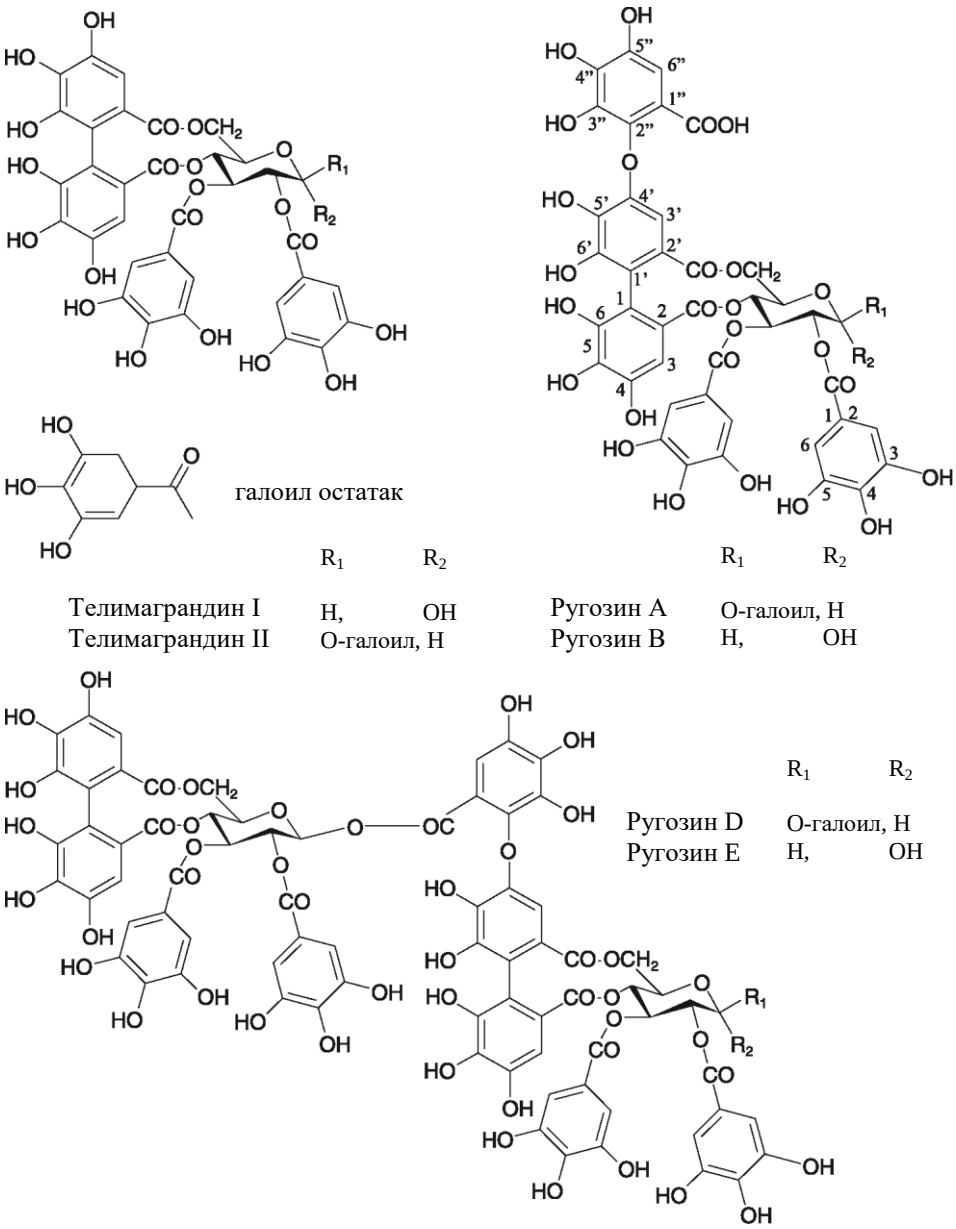


Слика 2.12. Структура 1,2,3,4,6-пентагалоилглукозе

Елагитанини су хидролизабилни танини добијени из пентагалоилглукозе, али за разлику од галотанина, они садрже додатне C-C везе између суседних галоил-група у молекулу пентагалоилглукозе. Ове C-C везе формирају се оксидативним куповањем између два суседна галоил остатка при чему настаје хексахидроксидифенол (HHDP) који може бити S- или R-конфигурације. Хиралност је резултат слободне ротације C-C везе уз присуство орто-супституената који стварају стерне сметње.[137,138] Назив елагитанини потиче од елагинске киселине која настаје спонтано од хексахидродифенилне киселине у воденом раствору преко интрамолекулске естерификације.

Сложени (комплексни) танини су група једињења чија је карактеристика молекул катехина везан гликозидном везом за или јединицу галотанина или за елагитанинску јединицу. Као што и сам назив указује, ове структуре су изузетно комплексне.[133]

Хемијске структуре неких елагитанина, који су идентификовани у испитиваним биљним врстама приказане су на *Слици 2.13.*



Слика 2.13. Хемијске структуре елагитанина идентификованих у биљкама из рода Filipendula. Преузето из Fecka (2009)[81]

2.3. Секундарни метаболити биљака

2.3.1. Биосинтетички путеви фенолних једињења у биљкама

Природна ароматична једињења настају помоћу два биосинтетичка пута: циклуса шикимске киселине и ацетатно–малонатног циклуса, а у циљу формирања основне структурне јединице флавоноида C_6–C_3–C_6. Циклус шикимске киселине обухвата биосинтезу ароматичних аминокиселина и природних фенолних једињења. Овај начин синтезе присутан је само у биљкама и микроорганизмима, не и код сисара, на шта сугерише и чињеница да су наведене аминокиселине есенцијалне за животиње и човека па се морају уносити исхраном.[134]

Централни интермедијер у шикиматном путу је свакако шикимска киселина, једињење које је први пут изоловано из звездастог аниса (*Illicium verum,* који се на јапанском назива „*шикими*“) много пре него што је откривена њена улога у метаболизму биљака. Аминокиселине фенилаланин и тирозин формирају основни C_6-C_3 скелет фенилпропана у многим природним фенолним једињењима, као што су циметне киселине, кумарини, лигнани и флавоноиди. Ове аминокиселине су, као уосталом и триптофан, прекурсори многих алкалоида. Поред тога, доказано је да многи прости деривати бензена, као што су гална киселина и *p*-аминобензоева киселина, настају у споредним реакцијама циклуса шикимске киселине.[1,133,134]

Циклус шикимске киселине (*Схема 2.1.*) започиње куповањем фосфоенолпирувата из циклуса гликолизе са D-еритрозо-4-фосфатом из пентозо-фосфатног пута, при чему у овој реакцији алдолног типа настаје 7-фосфо-2-арабино хептулонска киселина (DAHP). Елиминацијом фосфорне киселине из DAHP, катализовано NAD^+-зависним ензимом 3-дехидрохинат синтетазом, праћено интрамолекулском алдолном реакцијом, настаје први циклични интермедијер 3-дехидрохинска киселина. Њеном редукцијом помоћу хинат дехидрогеназе настаје хинска киселина. Елиминацијом воде из молекула 3-дехидрохинске киселине, у присуству ензима 3-дехидрогеназе, настаје 3-дехидро-шикимска киселина, а из ње деловањем шикимат дехидрогеназе настаје шикимска киселина. Из 3-дехидрошикимске киселине споредним реакцијама могу настати и просте фенолне киселине, као што су протокатехинска киселина (настаје дехидратацијом и енолизацијом 3-дехидрошикимске киселине) и гална киселина (настаје дехидрогенизацијом и енолизацијом 3-дехидрошикимске киселине).[134]

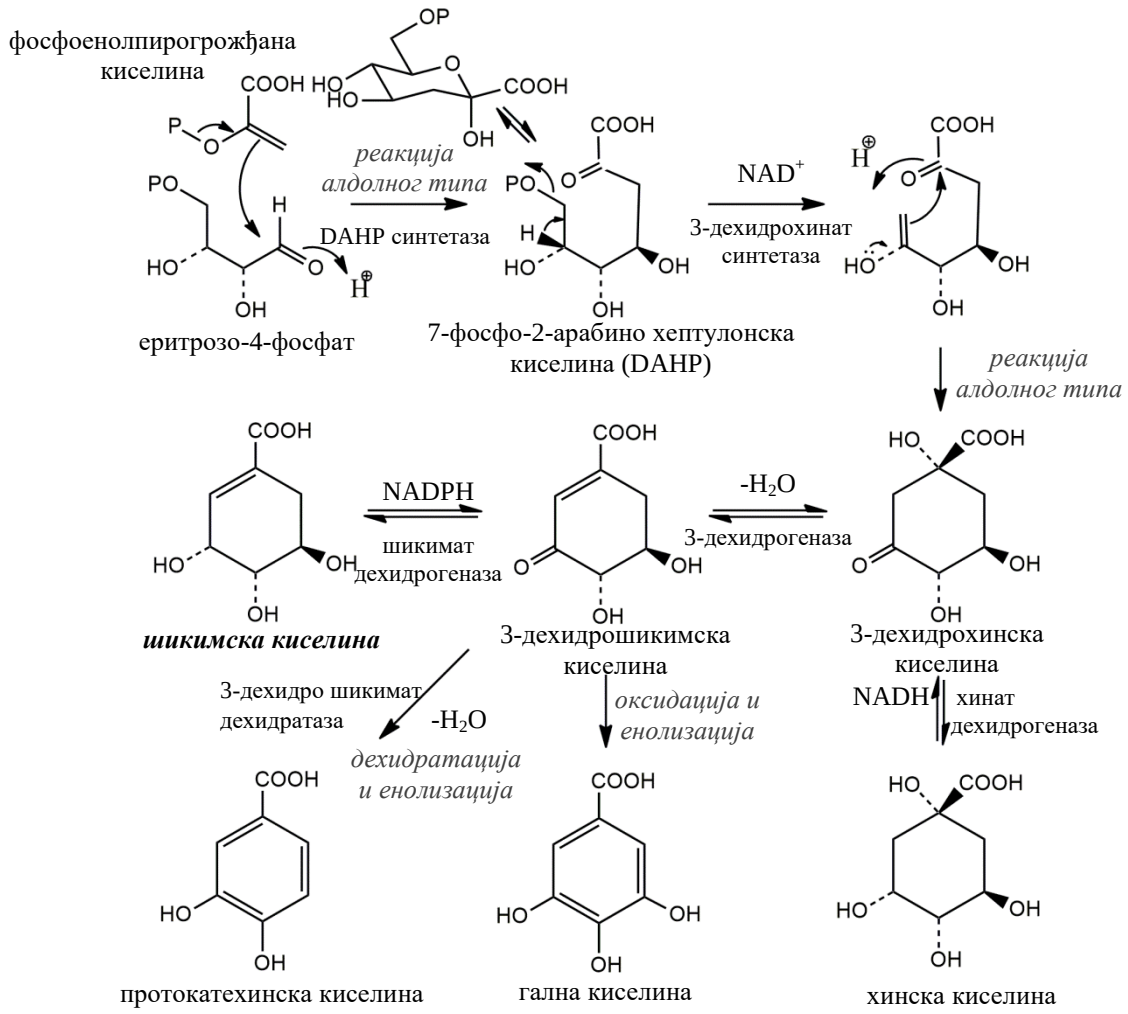


Схема 2.1. Синтеза шикимске киселине – почетак шикиматног циклуса

Гална киселина у биљкама се може наћи у слободном облику, али је и изузетно значајна у даљој синтези фенолних једињења па се може наћи и као компонента многих танина, као што су галотанини (естри галне киселине и глукозе, нпр. пентагалоилглукоза), елагитанини (оксидацијом и радикалским куповањем пентагалоилглукозе настаје телимаграндин II идентификован у биљкама из рода *Filipendula* Mill.). Хемијском хидролизом елагитанина може се добити хексахидрокси-дифенилна киселина која спонтаном лактонизацијом прелази у елагинску киселину, такође детектовану у многим врстама овог рода (*Схема 2.2.*).[133,137,138]

Најзначајније једињење које настаје у самом путу шикимске киселине је хоризминска киселина (*Схема 2.3.*). Из шикимске киселине АТР-зависном реакцијом фосфорилације настаје шикимска киселина 3-фосфат, а затим долази до адиционо-елиминационе реакције са фосфоенолпируватом, катализоване ензимом 5-енолпирувилшикимска киселина 3-фосфат синтетаза, при чему се формира 5-енолпирувилшикимска киселина 3-фосфат (EPSP). 1,4-елиминацијом фосфорне киселине из молекула EPSP деловањем ензима хоризмат синтетазе, добија се хоризминска киселина.[134]

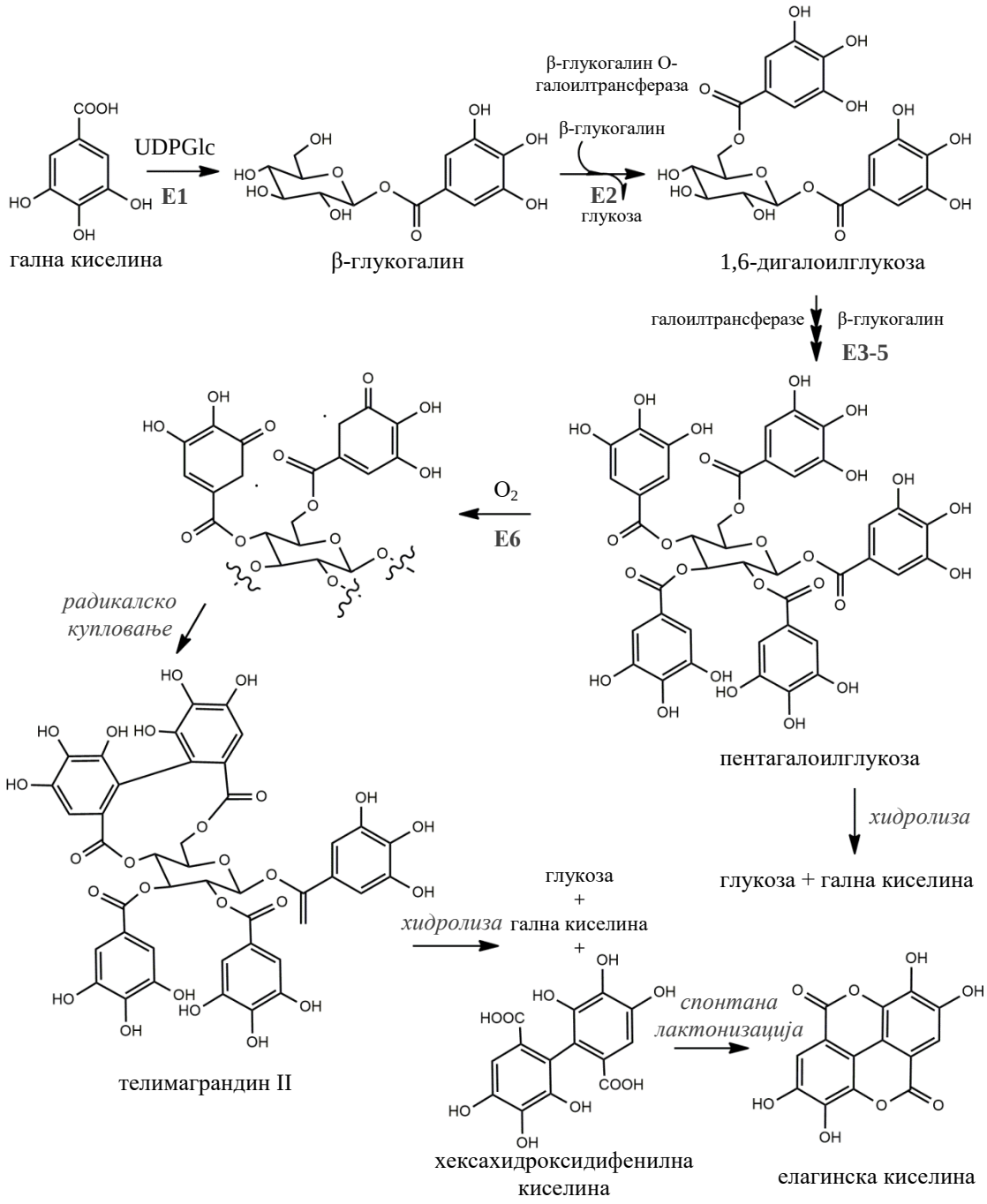


Схема 2.2. Синтеза пентагалоилглукозе, телимаграндина II и елагинске киселине

Ензими: *E1 – галат 1-β-глукозилтрансфераза; E2 – β-глукогалин O-галоилтрансфераза; E3-5 – галоилтрансферазе; E6 – пентагалоилглукоза O_2 оксидоредуктаза.*

Хоризминска киселина је изузетно значајна јер деловањем различитих ензима на молекул ове киселине долази до развијања нових синтетичких путева, што је приказано на *Схеми 2.4*. Код бактерија *sin*-елиминационом реакцијом под дејством хоризмат лиазе, из хоризминске киселине настаје 4-хидроксибензоева киселина, док је у биљкама синтеза ове киселине знатно сложенија и укључује деградацију циметних

киселина. Деловањем изохоризмат синтетазе на хоризминску киселину настаје њен изомер – изохоризминска киселина, из које се у микроорганизмима може синтетисати 2,3-дихидробензоева киселина, док се у биљкама, елиминационом реакцијом под дејством салицилат синтетазе, може формирати салицилна киселина. Даље, хоризминска киселина може бити и аминована на C-4 атому, а као крајњи производ добија се *p*-аминобензоева киселина (PABA) или се аминација може вршити на C-2 атому хоризминске киселине при чему настаје 2-аминобензоева (антранилна) киселина из које се може добити L-триптофан.

Поред наведених реакција хоризминске киселине, најзначајнији је наставак пута циклуса шикимске киселине, при чему долази до трансформације хоризминске киселине у префенску киселину. У овој реакцији типа Claisen-ове кондензације, настаје основни C_6-C_3 угљенични скелет фенилаланина (L-Phe) и тирозина (L-Tyr). Ова реакција је у природи катализована хоризмат мутазом.

Из префенске киселине добијају се финални продукти основног пута шикимске киселине, аминокиселине фенилаланин и тирозин. У основи синтезе фенилаланина су три реакције декарбоксилација, ароматизација и трансаминација, а у биосинтези тирозина поред наведених реакција долази и до оксидације (*Схема 2.4*.). L-фенилаланин и L-тирозин, са својом C_6-C_3 структуром, представљају основу за синтезу врло широког спектра природних једињења. У биљкама почетни корак је обично елиминација амонијака са споредног ланца како би се наградила одговарајућа *trans* (*E)* циметна киселина. Из фенилаланина у том случају се добија циметна киселина, док из тирозина настаје 4-кумаринска киселина (*p*-кумаринска киселина). Све биљке имају способност деаминације фенилаланина помоћу ензима фенилаланин амонијум лиазе, али је деаминација тирозина ограничена на само неке чланове фамилије трава. Даљом оксидацијом насталих циметних киселина добијају се кафеинска, ферулна и синапинска киселина, све изузетно заступљене у биљкама. Такође, из *p*-кумаринске, ферулне и синапинске киселине се добијају алкохоли, редом *p*-кумарил, конифериl и синапил алкохол, који учествују у синтези лигнана и лигнина у биљкама.[133,134]

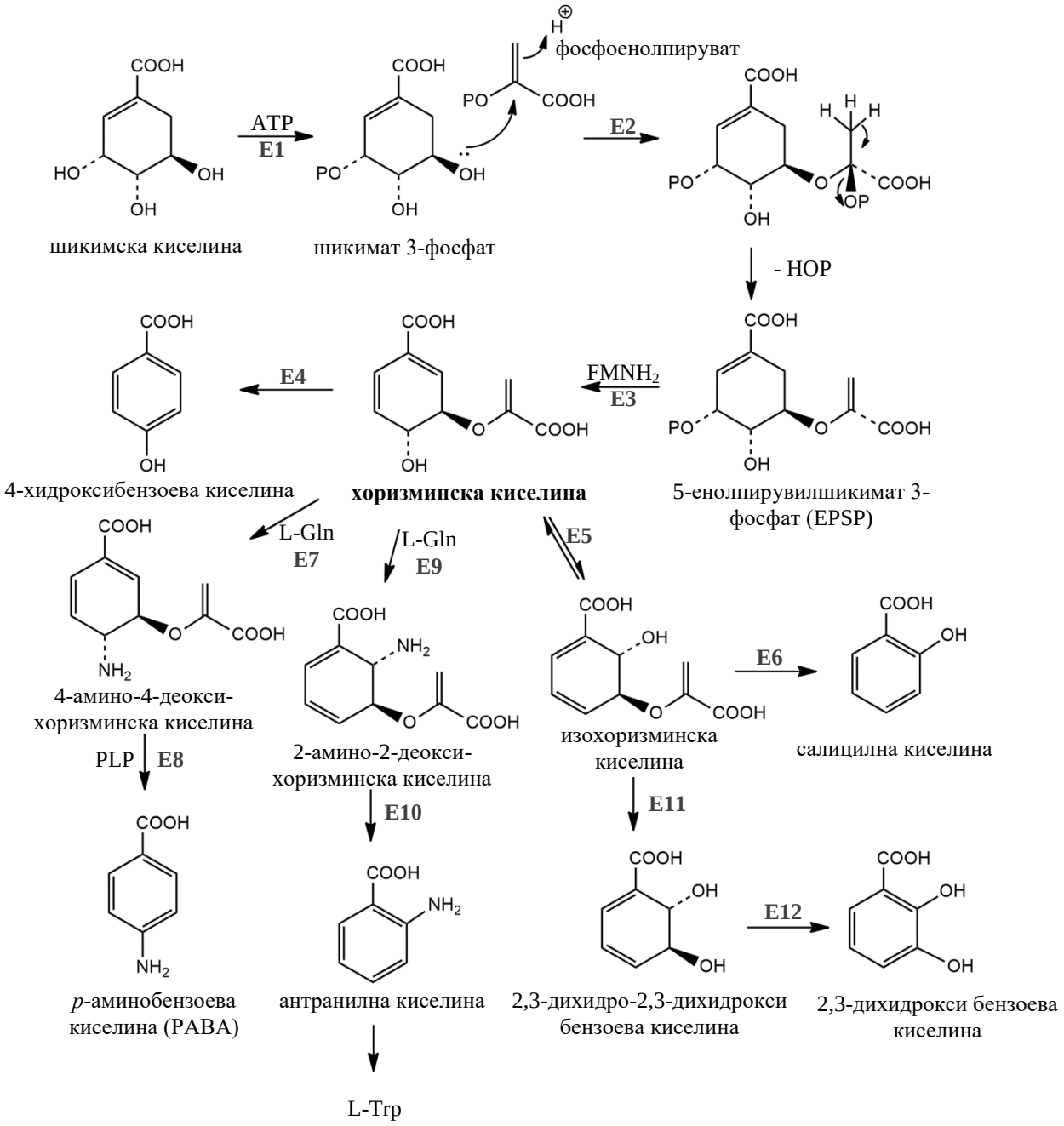


Схема 2.3. Синтеза хоризминске киселине и њене реакције – „тачка гранања“

Ензими: *E1 - шикимат киназа; E2 - EPSP синтетаза; E3 - хоризмат синтетаза; E4 - хоризмат лиаза; E5 - изохоризмат синтетаза; E6 - салицилат синтетаза; E7 - 4-амино-4-деоксихоризмат синтетаза; E8 - 4-амино-4-деоксихоризмат лиаза; E7 + E8 - p-аминобензоат синтетаза; E9 - 2-амино-2-деоксихоризмат синтетаза; E10 - 2-амино-2-деоксихоризмат лиаза; E9 + E10 – антранилат синтетаза; E11 - изохоризматаза; E12 - 2,3-дихидро-2,3-дихидроксибензоат дехидрогеназа.*

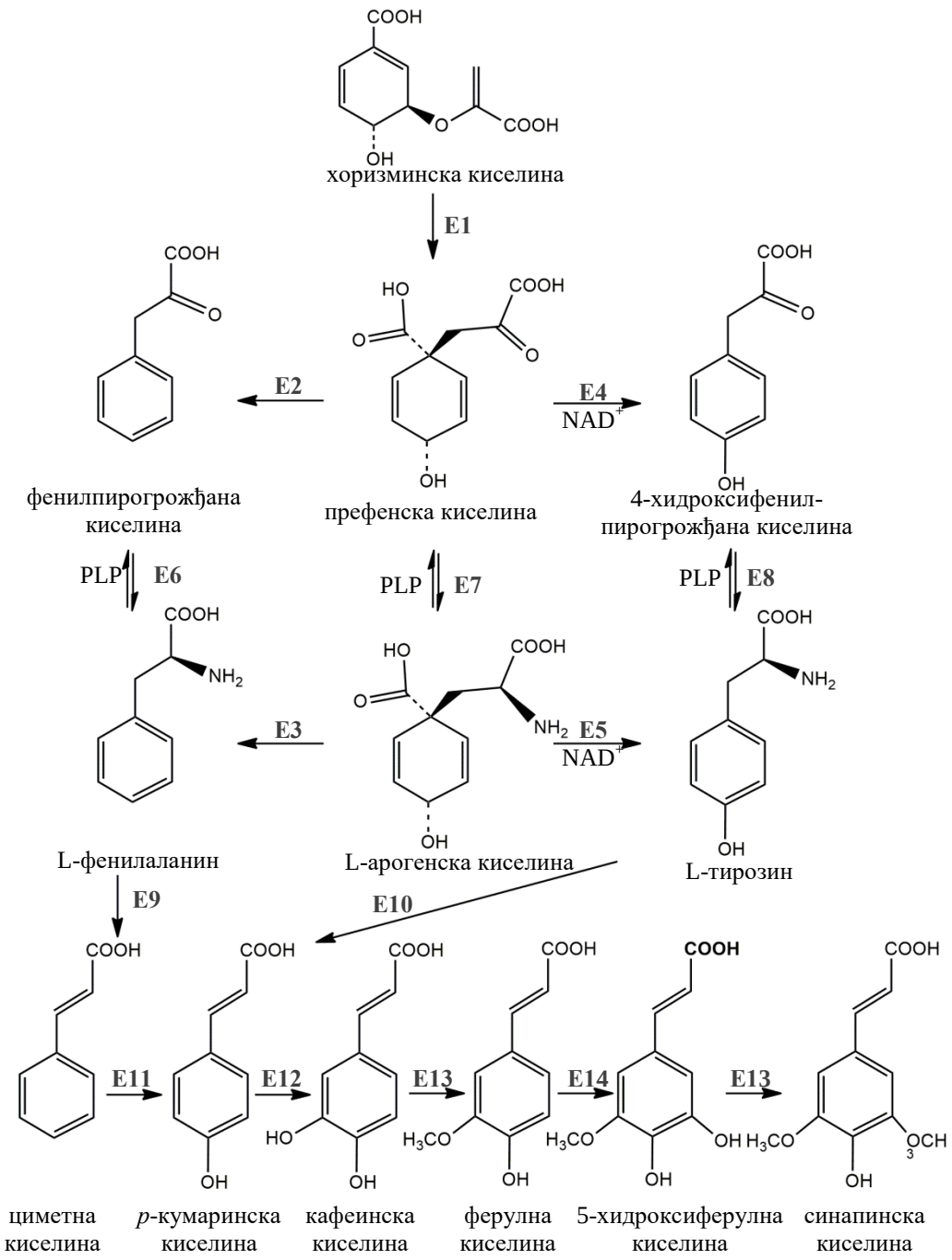


Схема 2.4. Биосинтеза фенилаланина и тирозина и добијање циметних киселина

Ензими: *E1 - хоризмат мутаза; E2 – префенат дехидратаза; E3 – арогенат дехидратаза; E4 – префенат дехидрогеназа; E5 - арогенат дехидрогеназа; E6 – фенилпируват аминотрансфераза; E7 – префенат аминотрансфераза; E8 - 4-хидроксифенилпируват аминотрансфераза; E9 – фенилаланин амонијум лиаза; E10 – тирозин амонијум лиаза; E11 – цинамат 4-хидроксилаза; E12 – p-кумарат 3-хидроксилаза; E13 –O-метил трансфераза; E14 – ферулат 5-хидроксилаза.*

Што се тиче фенолних киселина, генерално за род *Filipendula*, а посебно за две најзаступљеније биљне врсте, *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, од изузетног значаја је салицилна киселина и њени деривати, метил салицилат и салицилалдехид који су идентификовани у етарском уљу цвета обе биљке.[81,121] Као што је већ речено, салицилна киселина која је изолована из *F. ulmaria* послужила је за синтезу у свету данас највише коришћеног лека – аспирина.[78] У биљкама, салицилна киселина настаје хидроксиловањем бензоеве киселине, раскидањем споредног ланца 2-кумаринске киселине (*Схема 2.5.*) или, као што је већ приказано на *Схеми 2.3.*, из изохоризминске киселине дејством салицилат синтетазе.

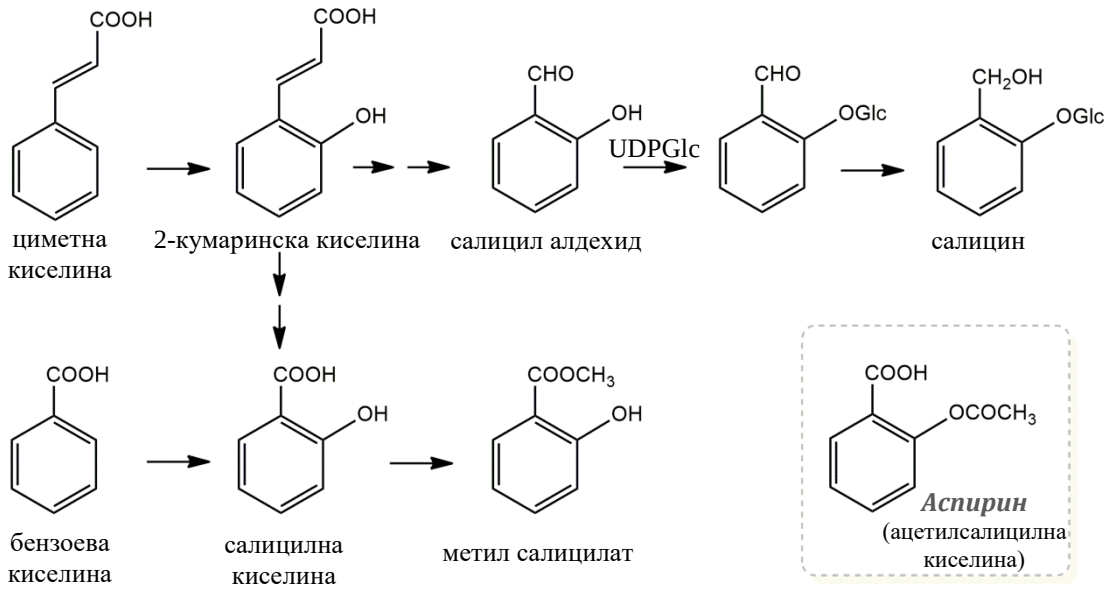
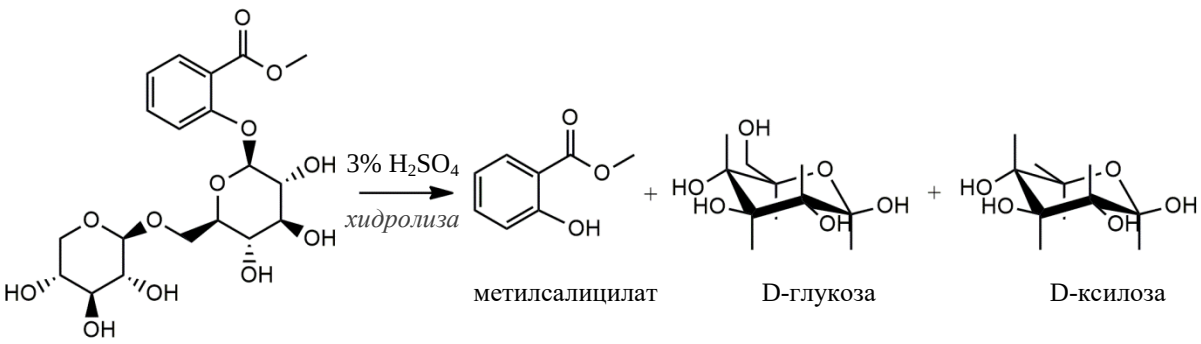


Схема 2.5 Биосинтеза салицилне киселине, метил салицилата и салицина

Метил салицилат настаје метиловањем салицилне киселине под дејством карбокси метил-трансферазе салицилне киселине. Салицин, једињење карактеристично за врсте из рода врба (род *Salix*, фам. Salicaceae), али је идентификован и у неким врстама рода *Filipendula*, не добија се директно из салицилне киселине, већ се претпоставља да механизам његове биосинтезе у биљкама укључује гликолизу салицилалдехида, а потом редукцију карбонилне групе. Поред салицилне киселине, бензил и метил салицилата, у екстракту хербе *F. ulmaria* идентификовано је још једно једињење из групе салицилата – гаултерин или 2-[(6-*O*-β-D-ксилопиранозил-β-D-глукопиранозил)окси] метил естар бензоеве киселине (синоними: монотропитин, монотропитозид, метил салицилат-2-глукоксилозид, метилсалицилат-2-примверозид)[139], чијом хидролизом се може добити метил салицилат (*Схема 2.6.*) и у следећем кораку естерификацијом се из метил салицилата може добити салицилна киселина.[140]



гаултерин
(метилсалицилат-2-примверозид)

Схема 2.6. Хидролиза гаултерина

Биосинтеза флавоноида је за биљке од изузетног значаја, јер флавоноиди имају круцијалну улогу у биолошкој активности биљака.[141–143] Почетни и основни молекул у синтези флавоноида је 4-хидроксицинамоил-коензим А (CoA). Ово једињење настаје низом реакција у оквиру шикиматног циклуса. Даље се деловањем ензима халкон синтетазе (за синтезу стилбена ензим је стилбен синтетаза) и уз учешће три молекула малонил-CoA формира поликетид, а затим кондензацијом новонастале јединице са *p*–кумаринском киселином формира се халкон, који постепено циклизује и долази до стварања флаванона нарингенина (односно у другом путу до синтезе стилбена ресвератрола) (*Схема 2.7.*).

Халкони представљају прекурсоре у синтези великог броја деривата флавоноида биљног порекла. Синтеза флаванона нарингенина у биосинтези флавоноида представља „тачку гранања" и од молекула нарингенина даље може доћи до синтезе разних структурних класа флавоноида, као што су флавони, флавоноли, антоцијанидини и катехини, што је приказано на *Схеми 2.7.* Тако да, од молекула нарингенина и ериодиктиола, који се разликује само по једној хидроксилној групи, помоћу различитих ензимских система, реакцијама оксидације, редукције и дехидратације, може настати јако велики број полифенолних једињења, од апигенина и лутеолина, затим кверцетина и кемпферола, антоцијанидина, па све до афзелехина и катехина и њихових епи-изомера.

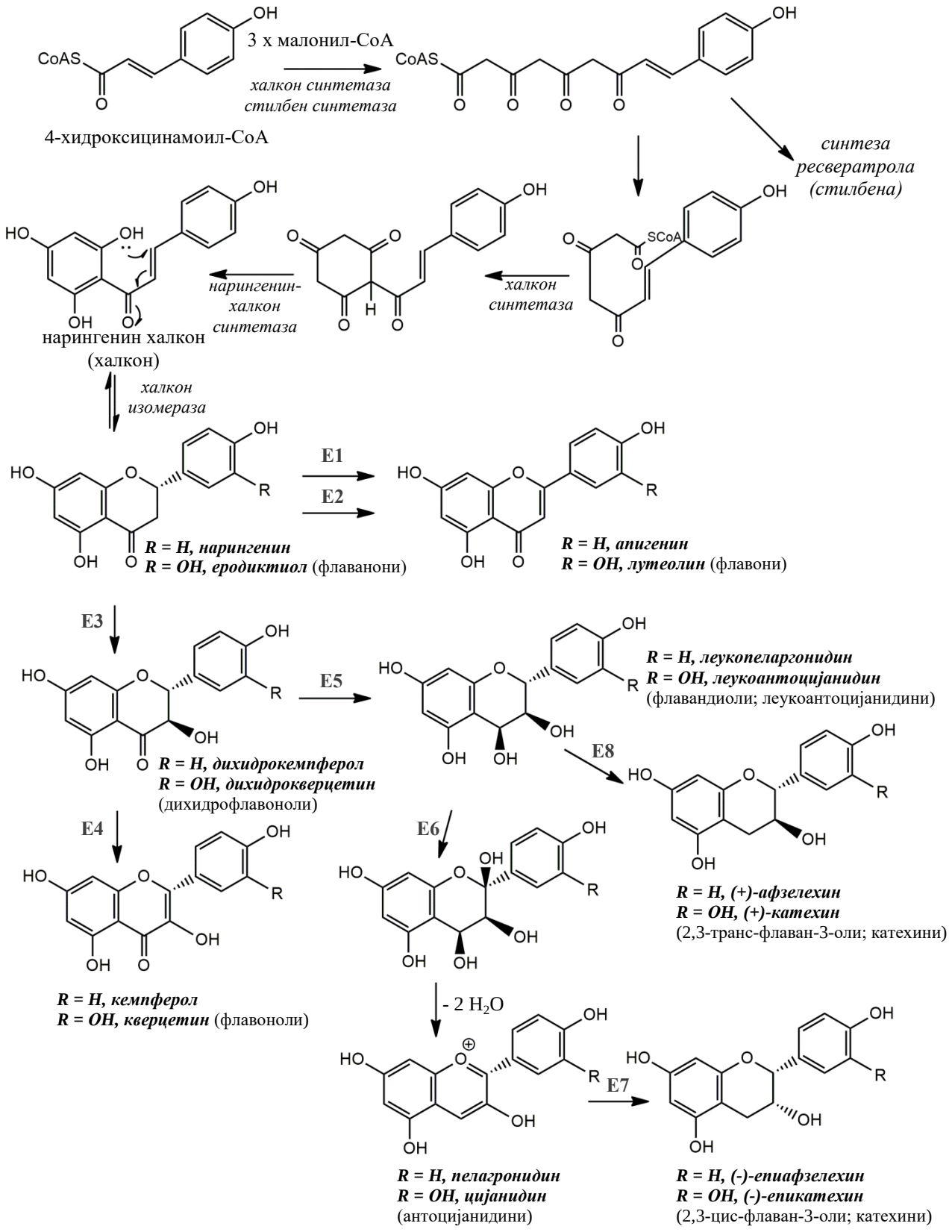


Схема 2.7. Биосинтеза флавоноида, флавона, флавонола, антоцијанидина и катехина

***Ензими**: E1 – флавон синтетаза I; E2 – флавон синтетаза II; E3 – флаванон 3-хидроксилаза; E4 – флавонол синтетаза; E5 – дихидрофлаванол 4-редуктаза; E6 – антоцијанидин синтетаза; E7 – антоцијанидин редуктаза; E8 – леукоантоцијанидин редуктаза.*

2.3.2. Биолошка активност и терапеутски потенцијал фенолних једињења

На основу многих искустава, научних извора, као и документованих различитих биохемијских механизама, закључује се да фенолна једињења, пре свега флавоноиди (названи још и полифеноли), играју значајну улогу у превенцији и третману различитих обољења. Свакодневном исхраном човек уноси у свој организам разноврсне нутритијенте, међу којима и фенолна једињења, присутна претежно у воћу и поврћу, затим у житарицама, али и у неким већ прерађеним намирницама. Неопходно је нагласити да се већина научних испитивања биолошких активности фенолних једињења базира на *in vitro* методама, где се користе чисти ензими, различите ћелијске културе, изолована ткива, полифенолни агликони и неки гликозиди који су присутни у храни. Тако да при тврдњама да неко фенолно једињење поседује одређени биолошки и терапеутски ефекат треба узети у обзир и метаболичке промене датог једињења након уноса у организам.[132,144] Стога је разумевање појмова биолошка доступност и биолошка расположивост од изузетног значаја када се говори о потенцијалним ефектима фенолних једињења на здравље људи. Термин биолошка расположивост односи се на количину било којег састојка хране који је присутан у цревима и који може да прође кроз интестиналну баријеру. С друге стране, биолошка доступност представља подкатегорију апсорпције и односи се на део унете дозе компоненте (у овом случају фенолног једињења) која непромењена долази у системску циркулацију. Тако да се у ствари биолошка доступност односи на биолошки расположиве компоненте које се апсорбују и прелазе у крвоток како би биле дистрибуиране и метаболисане у различитим органима.[132] Биолошка доступност се разликује у великој мери између различитих полифенолних једињења, а најзаступљенији полифеноли у нашој исхрани нису нужно и они који имају највећу биолошку доступност.[145] Отуда је неопходно да се јасно утврде ефекти конзумирања полифенола и да се идентификују она једињења која у највећој мери утичу на здравље људи, што се може постићи разјашњавањем биолошке доступности и метаболичких реакција полифенола.

Метаболизам полифенола одвија се на уобичајени начин. Апсорпција агликона се дешава у танком цреву, али како је већина полифенола у храни присутна у облику естара, гликозида или полимера, који се у тој форми не могу апсорбовати, то они морају подлећи процесу хидролизе помоћу интестиналних ензима или цревне микрофлоре.[146] Током апсорпције полифеноли бивају конјуговани, прво у танком цреву, а потом и у јетри, где су укључена три типа реакција конјугације на положају С3 – метиловање, сулфоновање и глукуронидовање, катализовани ензимима из групе трансфераза: катехол-*О*-метил трансфераза, сулфотрансфераза и UDP-глукуронозил трансфераза. Ове реакције чине тзв. процес метаболичке детоксикације који је заједнички за многе ксенобиотике, при чему се смањују њихови токсични ефекти и повећањем хидрофилности олакшава њихова елиминација путем билијарног и уринарног тракта.[132,144,145,147]

Полифенолни метаболити који се налазе у циркулацији нису слободни, већ су као конјуговани деривати везани за протеине, пре свега за албумин. Међутим, афини-

тет везивања полифенола за албумин варира у односу на њихову хемијску структуру. Они имају способност уласка у ткива, нарочито у она где су метаболисани. Концентрација метаболита полифенола у крвној плазми и ткивима одређује њихову биолошку вредност и расположивост, а те вредности могу варирати код различитих фенолних једињења. Полифеноли и њихови деривати се углавном елиминишу из организма путем урина и жучи. Полифеноли се излучују путем билијарног тракта у дуоденум, где су изложени дејству бактеријских ензима, посебно β-глукуронидазе, чијим деловањем долази до отварања цикличних прстенова, добијају се мањи молекули као што су фенолне киселине и хидроксицинамати, а потом они могу бити наново реапсорбовани. Овај вид ентерохепатичке реапсорпције може довести до продуженог присуства полифенола у телу.[130,144,145,148]

Што се тиче метаболизма фенолних киселина, овај процес састоји се од веома брзе апсорпције у танком цреву, а потом прати исте кораке конјугације, транспорта и екскреције. Циметне киселине се у природи обично налазе естерификоване, па је тиме њихова апсорпција отежана. Рецимо и то да у ткивима и телесним течностима човека не постоје естеразе које би могле хидролизовати хлорогенску киселину, како би се добила кафеинска киселина, па је та реакција једино могућа захваљујући цревној микрофлори. На основу хемијских особина фенолних киселина могу се предвидети њихове потенцијалне фармаколошке активности *in vitro*, али *in vivo* ефекат фенолних киселина највише зависи управо од начина метаболисања, концентрације у плазми и ткивима, као и од синергистичких ефеката.[145,149,150]

Фенолним једињењима се приписује широк спектар активности које су повезане са смањењем ризика од настанка многих хроничних обољења, укључујући канцер, кардиоваскуларне болести, хронична запаљења и многа дегенеративна обољења. Ове супстанце могу утицати на здравље на различите начине: као супстрати за многе биохемијске реакције; као кофактори или инхибитори ензимских реакција; као лиганди делују као антагонисти и агонисти ћелијске површине или интраћелијских рецептора; као „хватачи“ реактивних или токсичних једињења; као компоненте које побољшавају апсорпцију и/или стабилност есенцијалних нутритијената; као селективни фактори раста неких гастричних или интестиналних бактерија и као селективни инхибитори раста неких штетних интестиналних бактеријских врста.[151]

Када се говори о здравственим бенефитима полифенола и фенолних киселина, обично се у први план истиче њихова антиоксидативна активност. Поред тога што полифеноли директно реагују са штетним слободним радикалима у организму, сматра се да постоји још индиректних механизама антиоксидативног деловања, као што је редуковање оксидативног стреса инхибицијом ксантин оксидазе и утицајем на пораст ендогених антиоксиданата. Такође, метаболизам полифенола има значајан ефекат јер се метаболишу, као што је већ речено, на исти начин као и разни ксенобиотици или ендогени хормони. Штавише, неки флавоноиди могу деловати као инхибитори цитохрома P450 и на тај начин повећа биолошку доступност неких других лековитих супстанци.[135,144–146]

Полифенолни антиоксиданти су повезани и са побољшањем здравственог стања старије популације, утичу на болести које се јављају у том периоду живота, али и на сам процес старења.[145,152–154] Неуропротективну активност велики број фенолних једињења испољава у неуродегенеративним и когнитивним процесима, интеракцијом са неуронским и глијалним путевима, тако што утичу на експресију гена и спречавају одумирање ћелија. Они стимулишу регенерацију неурона, смањују оксидативни стрес, смањују оштећење неурона, редукују могућност настанка Алцхајмерове и Паркинсонове болести, утичу на побољшање психомоторне активности, памћења, учења, когнитивних способности и препознавања објеката. [130,144,155,156]

Фенолна једињења имају изузетно значајну улогу код кардиоваскуларних обољења (познати „Француски парадокс“ – низак ниво кардиоваскуларног морталитета код медитеранских народа који је у вези са конзумацијом црвених вина и поред повећаног уноса хране богате високо засићеним мастима). Исхрана богата полифенолима има вазопротективне ефекте у нормалном здравственом стању, као и код хроничних обољења, јер полифеноли испољавају антиоксидативну заштиту, снижавају крвни притисак, инхибирају агрегацију тромбоцита, оксидују липопротеине мале густине (LDL), смањују инфламаторне одговоре, побољшавају ендотелну функцију итд.[144,152,157,158]

Антиканцерогени или антитуморски ефекат фенолних једињења огледа се у смањењу оксидативног стреса, уклањању канцерогеног агенса, утицају на сигнализацију у ћелијама рака, смањивању напредовања ћелијског циклуса, подстицању апоптозе, модулацији ензимске активности (каталазе, супероксид дисмутазе, глутатион-S-трансферазâ, ензима цитохрома P450 и др.), заштити ДНК од мутагена, активацији различитих сигналних путева и каскада.[152,155,158]

Различити полифеноли учествују у превенцији оштећења јетре и бубрега, гастроинтестиналних болова и озледа, обољења билијарног тракта и иритација желуца. Такође, утичу на подизање имунитета и имају антивиралне и антимикробне ефекте.[144]

Антиинфламаторне особине су још једна од карактеристика коју испољавају многа фенолна једињења. Полифеноли имају способност инхибирања синтезе еикозаноида који учествују у инфламаторном одговору, тако што у путу арахидонске киселине инхибирају ензимску активност фосфолипазе A_2, циклооксигеназа (COX-1 и -2) и липоксигеназа (LOX-5, -12 и -15), утичу на продукцију проинфламаторних молекула и проинфламаторну експресију гена, врше инхибицију дегранулације неутрофила, а инхибицијом тирозин киназе директно делују на спречавање неконтролисаног ћелијског раста и пролиферације.[158,159] Како је хронична инфламација повезана са многим обољењима (неуролошки поремећаји, канцер, хроничне инфламаторне болести, кардиоваскуларна и обољења коштаног система, метаболички поремећаји и гојазност), то је антиинфламаторни потенцијал фенолних једињења постављен у основу третмана наведених здравствених проблема.[160]

2.4. Оксидативни стрес и антиоксидативни потенцијал лековитих биљака

Слободни радикали су атоми, молекули или јони са једним или више неспарених електрона у последњој орбитали, услед чега су изузетно нестабилни и веома неселективно реактивни према другим молекулима.[161] Слободне радикале међу првима је описао М. Гомберг (Moses Gomberg) пре више од једног века (1900. године, рад о тривалентном угљенику).[162] Јако дуго се мислило да они нису присутни у биолошким системима због високе реактивности и кратког времена живота. Међутим, неколико деценија касније испитивање улоге слободних радикала у биолошким процесима је узело маха, тако да је установљено да су они укључени у неке патолошке процесе и старење. Од тада је знање о слободним радикалима значајно увећано, па се сада зна да су они активни учесници у различитим процесима у живим организмима, али и да се не могу сматрати само као оштећујући агенси, већ и стални чиниоци многих нормалних функција у организму.[163] Једну од најпрецизнијих дефиниција појма слободни радикал дао је Б. Халивел (Barry Halliwell) 1991. године и она гласи: „Слободни радикал је било која врста способна за независно постојање и садржи један или више неспарених електрона, при чему је неспарени електрон сам у орбитали“.[164]

Извори слободних радикала могу бити егзогене и ендогене природе. Унутар живог организма (ендогено) слободни радикали настају као део нормалног метаболизма у митохондријама, деловањем ксантин оксидазе, пероксизома, исхемије, фагоцитозе, инфламаторних процеса, арахидонатног пута, физичке активности и др. Спољашњи фактори који утичу напроизводњу слободних радикала су разни лекови, загађивачи животне средине, пестициди, дувански дим, различити типови зрачења, индустријски растварачи и озон.[161,165] Преглед неких реакција у живом организму, где се као производи формирају слободни радикали, приказани су на *Схеми 2.8*.

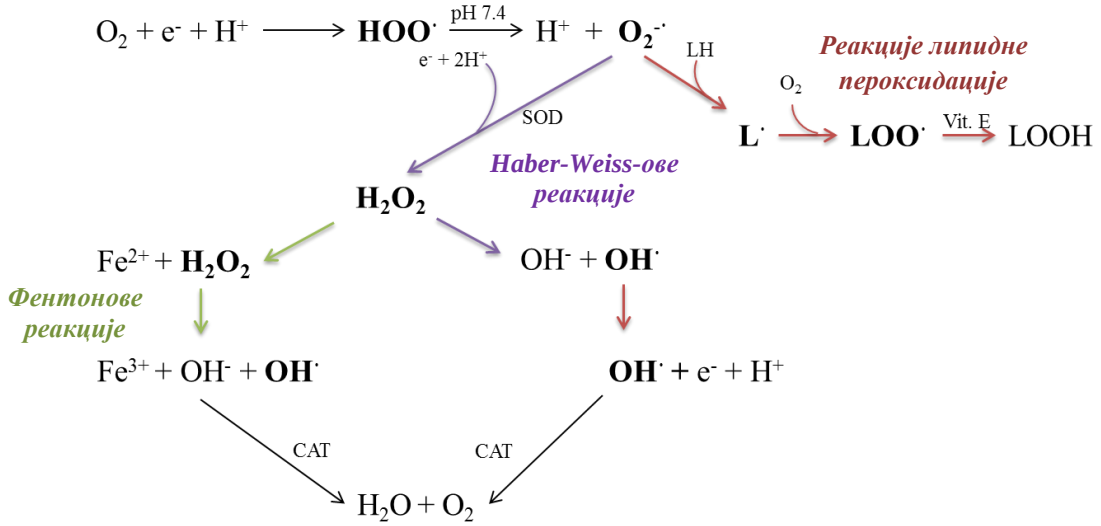


Схема 2.8. Преглед реакција које воде формирању реактивних врста кисеоника (ROS). Модификовано из Carocho и Ferreira (2013).[161] *CAT – каталаза; SOD – супероксид дисмутаза*

У биолошким системима слободни радикали (реактивне врсте) у својој структури имају три елемента: кисеоник (O), азот (N) и сумпор (S), па разликујемо реактивне врсте кисеоника (ROS – *енг.* „reactive oxygen species“), реактивне врсте азота (RNS – *енг*. „reactive nitrogen species“) и реактивне врсте сумпора (RSS – *енг*. „reactive sulfur species“) (*Табела 2.3.*).[161,166] Оно што представља велику иронију у читавом овом систему јесте да су управо ови елементи есенцијални за живот, али због формирања слободних радикала испољавају и штетна дејства на организам. Поред слободних радикала, у реактивне врсте убрајају се и изузетно реактивни нерадикалски облици, као што су водоник пероксид (H_2O_2) и органски пероксиди, синглетни кисеоник ($^1O_2$), хипохлорна киселина (HOCl), озон (O_3), пероксинитрити, тиоли и тиосулфонати.[166,167]

Табела 2.3. Реактивне врсте кисеоника, азота и сумпора[166,167]

Реактивне врсте	*Слободни радикали*	*Нерадикалски облици*
Реактивне врсте кисеоника (ROS)	$O_2^{\cdot-}$, супероксидни анјон радикал $HO^{\cdot}$, хидроксил радикал $HOO^{\cdot}$, хидропероксил радикал $RO^{\cdot}$, алкокси радикал $ROO^{\cdot}$, алкилпероксил радикал $CO_2^{\cdot-}$, угљендиоксидни радикал $CO^{\cdot-}$, угљенмоноксидни радикал	H_2O_2, водоник пероксид HOCl, хипохлорна киселина HOBr, хипобромна киселина $^1O_2$, синглетни кисеоник O_3, озон ROOH, органски пероксиди
Реактивне врсте азота (RNS)	$NO^{\cdot}$, азотмоноксидни радикал $NO_2^{\cdot}$, азотдиоксидни радикал	NO_2^-, азотдиоксидни анјон NO_2^+, азотдиоксидни катјон $ONOO^-$, пероксинитрит ONOOH, пероксинитритна киселина ROONO, алкил пероксинитрит NOOCl, нитрил хлорид
Реактивне врсте сумпора (RSS)	$RS^{\cdot}$, тиил радикал	RSH, тиол RSSR, дисулфид RSOH, сулфенска киселина RS(O)SR, тиосулфонат (дисулфид-S-моноксид) $RS(O)_2SR$, тиосулфонат (дисулфид-S-диоксид)

Слободно-радикалске реакције су ланчане природе и састоје се из три фазе: I – фаза иницијације, II – фаза пропагације и III – фаза терминације (*Реакције 1-10*).[168]

I – фаза иницијације

$RH \rightarrow R^{\cdot} + H^{\cdot}$ (1)

$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$ (2)

$2\ ROOH \rightarrow ROO^{\cdot} + RO^{\cdot} + H_2O$ (3)

II – фаза пропагације $R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$ (4)

$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$ (5)

$RO^{\cdot} + RH \rightarrow ROH + R^{\cdot}$ (6)

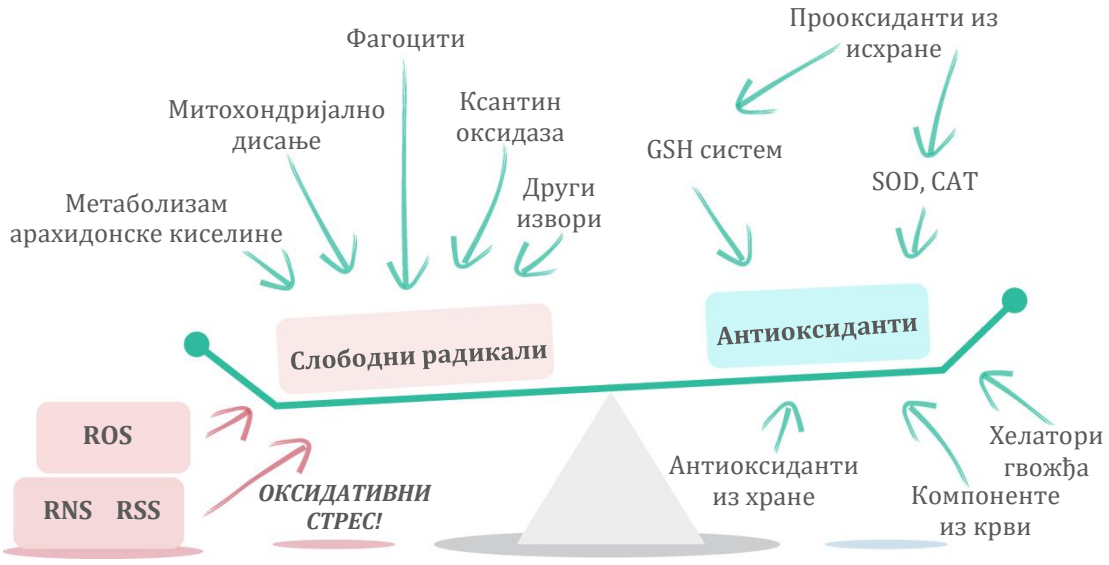
III – фаза терминације $R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow R\text{-}R$ (7)

$R^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR$ (8)

$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR + O_2$ (9)

Антиоксидант + радикал → редуковани облик радикала + оксидовани облик антиоксиданта (10)

Негативна страна слободних радикала свакако јесте њихова велика реактивност према свим класама примарних биомолекула (протеини, угљени хидрати, липиди и нуклеинске киселине).[154,164] Они могу реаговати са другим стабилним молекулима на бројне начине и различитим типовима реакционих механизама, као што су: 1) доniрање електрона тј. редуковање радикала, и примање електрона тј. оксидовање радикала, 2) преузимање водоника, 3) реакције адиције, 4) реакције самоуништења, 5) диспропорционисање радикала.[161] Као производи ових реакција добијају се друге врсте ROS, RNS и RSS чија се реактивност повезује са настанком многих озбиљних акутних и хроничних обољења. Нека од њих су разни типови малигних обољења, инфламације, реуматоидни артритис, неуролошка обољења, поремећаји у раду јетре и бубрега, кардиоваскуларна обољења, дијабетес, Алцхајмерова и Паркинсонова болест, синдром аутоимуне дефицијенције, и многа друга обољења.[169–172]



Слика 2.14. Равнотежа између реактивних врста и антиоксиданата in vivo. Модификовано из Halliwell (2008).[173]

Разлог за овакво деловање слободних радикала лежи у настанку и развитку процеса названог *оксидативни стрес* у организму при нарушавању редокс хомеостазе у ћелијама, односно стања када производња ових реактивних врста надвлада механизме одбране организма.[166] Генерално, у организму постоји уравнотежен систем продукције слободних радикала и активности антиоксиданата, једињења која делују супротно слободним радикалима, при чему реактивне врсте испољавају своје корисне особине, док су негативне последице у највећем делу редуковане (*Слика 2.14.*).[165] Дакле, уколико се успостављена равнотежа наруши, било хиперпродукцијом слободних радикала (нарочито ROS), било смањеном количином и активношћу антиоксиданата, у ћелијама се јављају симптоми оксидативног стреса.[161]

Фактори настанка оксидативног стреса у ћелијама живог организма су:

- повећан ниво ендогених и егзогених једињења која улазе у процес аутооксидације праћен производњом слободних радикала;
- смањење резерви антиоксиданата мале молекулске масе;
- инактивација антиоксидативних ензима;
- смањена производња антиоксидативних ензима и антиоксиданата мале молекулске масе;
- комбинације два или више претходно наведених фактора.[163]

Како су реакције слободних радикала ланчане природе, што значи да пропагација условљава настанак секундарних радикала који даље ступају у каскадне реакције (тзв. синдром „зачараног круга“), то је борба против развијања оксидативног стреса у ћелијама од изузетног значаја. У тој борби круцијалну улогу имају, горе поменути, *антиоксиданти*. Они су дефинисани од стране већ поменутог Б. Халивела, познатог научника у области оксидативног стреса, као „супстанце које одлажу, превенирају или уклањају оксидативно оштећење на циљаном молекулу“.[165]

Дакле, антиоксиданти делују супротно једињењима која изазивају оксидативни стрес – прооксидантима. И заиста, антиоксиданти делују тако што:

- инхибирају рекације оксидације у којима се продукују слободни радикали (превентивни оксиданти);
- спречавају пропагацију ланчаних реакција аутооксидације;
- делују као „хватачи“ синглетног кисеоника;
- постоји синергизам са другим антиоксидантима;
- као редукциони агенси преводе хидропероксиде у стабилна једињења;
- хелатирају металне прооксиданте (деривате гвожђа и бакра) и преводе их у стабилне производе;
- инхибирају прооксидативне ензиме (нпр. липоксигеназе).[161]

Најважнија „последица“ деловања антиоксиданата јесте да, након реакције са штетним слободним радикалом, долази до формирања новог радикала који је стабилизован интрамолекулским водоничним везама, резонанцијом или даљом оксидацијом.[164]

Постоји више подела антиоксиданата и антиоксидантних система. Једна од њих је на основу места синтезе, па разликујемо ендогене (синтетишу се у организму) и егзогене (у организам се уносе исхраном) антиоксиданте. Друга подела подразумева начин деловања антиоксиданата, тако да постоје антиоксиданти са превентивним дејством који спречавају реакције иницијације у радикалским ланчаним реакцијама и антиоксиданти који делују у фази пропагације и прекидају ланчану реакцију слободних радикала.[163,174]

Најзначајнија подела антиоксидантних система у организму јесте на две велике групе – ензимске и неензимске антиоксидантне системе. Ензимски системи се састоје од примарне и секундарне ензимске одбране. Ензимска обухвата четири изузетно значајна ензима који спречавају формирање слободних радикала или исте неутралишу: каталаза – CAT (катализује превођење водоник пероксида у воду и молекулски кисеоник), супероксид дисмутаза – SOD (преводи супероксид анјоне у водоник пероксид, који се супстрат за каталазу); глутатион редуктаза (катализује редукцију оксидованог глутатиона) и селенопротеин глутатион пероксидаза (редукује пероксиде). Неензимска антиоксидативна заштита обухвата различите ендогене антиоксиданте, као што су витамини (А, Е, Ц, и провитамин А), коензим Q (убихинон), пептиди (глутатион), азотна једињења (мокраћна киселина) и друга једињења (албумин, трансферин, феритин, хемоглобин, билирубин, хистидин итд.).[161,166]

Иако ендогени антиоксидантни системи имају изузетну активност, они нису довољни у одржавању ниске концентрације слободних радикала, па је потребно потпомоћи антиоксидативну одбрану уношењем антиоксиданата путем исхране. У оквиру ове групе егзогених антиоксиданата разликују се једињења из природних извора (природни антиоксиданти) и она синтетисана у лабораторијским условима (синтетички антиоксиданти). У природне антиоксиданте се, поред већ наведених витамина, убрајају и фенолна једињења биљног порекла, као што су фенолне киселине, флавоноиди и њихови деривати. Најефикаснији синтетички антиоксиданти су бутилхидрокси толуен (BHT), бутилхидрокси анизол (BHA), пропил галат (PG) и терцијарни бутилхидро-хинон (TBHQ), а најчешће се користе као додаци прехрамбеним производима како би се спречило смањење квалитета хране услед деловања слободних радикала и настанка липидне пероксидације, очувала свежина, нутритивна вредност, укус и боја и продужио рок трајања намирница.[168]

Фенолна једињења (с посебним нагласком на флавоноиде) могу да спрече оштећења настала дејством слободних радикала различитим механизмима: директно реаговање са ROS, активација антиоксидативних ензима, хелатација метала, редукција α-токоферил радикала, инхибиција оксидаза, ублажавање нитрозативног стреса, повећање количине мокраћне киселине, повећање антиоксидативних особина нискомолекулских антиоксиданата.[142] Антиоксидативна активност флавоноида зависи првенствено од конфигурације (планарна структура фенола дозвољава конјугацију и делокализацију електрона, као и резонанциони ефекат), затим од броја и положаја OH група у молекулу и од присуства додатних функционалних група (C=C или C=O). Дакле, најзначајније структурне карактеристике флавоноида потребне за ефикасну

реакцију са слободним радикалима су: 1) *орто*-дихидрокси положај ОН група на В прстену флавоноида за делокализацију електрона; 2) 2,3-двострука веза у конјугацији са 4-оксо групом на С прстену за делокализацију електрона са В прстена; 3) хидроксилне групе на положајума 3 и 5 на А прстену омогућавају стварање водоничних веза са оксо групом (обележени на *Схеми 2.9.* на примеру кверцетина).[135,142,175,176]

Што се директне реакције са слободним радикалима тиче, флавоноиди делују као „хватачи“ реактивних врста захваљујући хидроксилним групама у својој структури. В прстен у флавоноидној стуктури посебно је значајан за одређивање способности „хватања“ слободних радикала. Добра особина флавоноида је да, након реакције са једним слободним радикалом, настали флавоноидни радикал може неутралисати још једну реактивну врсту при чему настаје стабилна структура хинона (*Схема 2.9.*).[142] Антиоксидативна активност може бити увећана полимеризацијом флавоноида (добијање кондензованих танина или полимерних катехина).

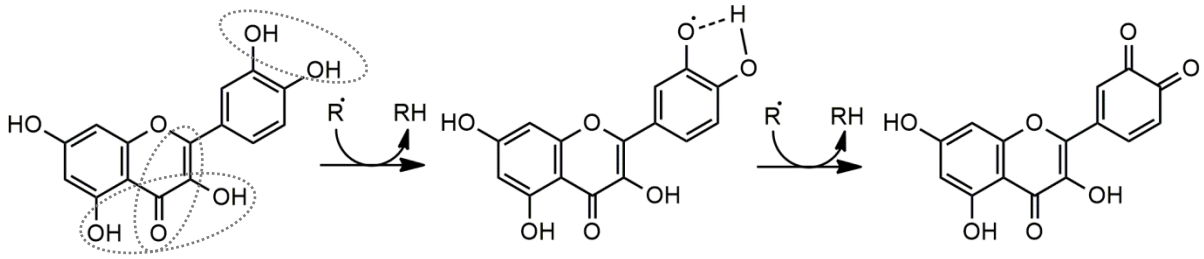


Схема 2.9. Неопходне структурне карактеристике флавоноида и механизам директног „хватања“слободних радикала (кверцетин)[176]

Поред већ наведеног механизма антиоксидативног деловања полифенола директним „хватањем“ слободних радикала, названог још и HAT механизам (*енг.* „hydrogen atom transfer“ – директан пренос атома водоника), постоје још два механизма круцијална за деловање полифенола, а то су SET механизам (*енг.* „single electron transfer“ – пренос једног електрона) и TMC механизам (*енг.* „transition metals chelation“ – хелатација прелазних метала) чије су реакционе основе приказане на *Схеми 2.10*. У HAT механизму деловања долази до хомолитичког раскидања ОН везе, при чему водоник прелази на слободни радикал ($R^{\cdot}$) који тако бива неутралисан (RH). У SET механизму полифенол донира електрон слободном радикалу ($R^{\cdot}$) и формира се енергетски знатно стабилнији анјон (R^{-}) и радикал-катјон полифенола који је врло мало реактиван. TMC механизам подразумева могућност полифенола да стварају стабилне комплексе са прелазним металима који могу изазвати оксидативни стрес.[175] У HAT механизму настали феноксил радикал је изузетно стабилизован делокализацијом неспареног електрона у ароматичном прстену, што даље води ка реакцијама терминације. Такође, супституенти на ароматичном прстену могу утицати на стабилност и самим тим на способност антиоксидативног деловања фенола.[157]

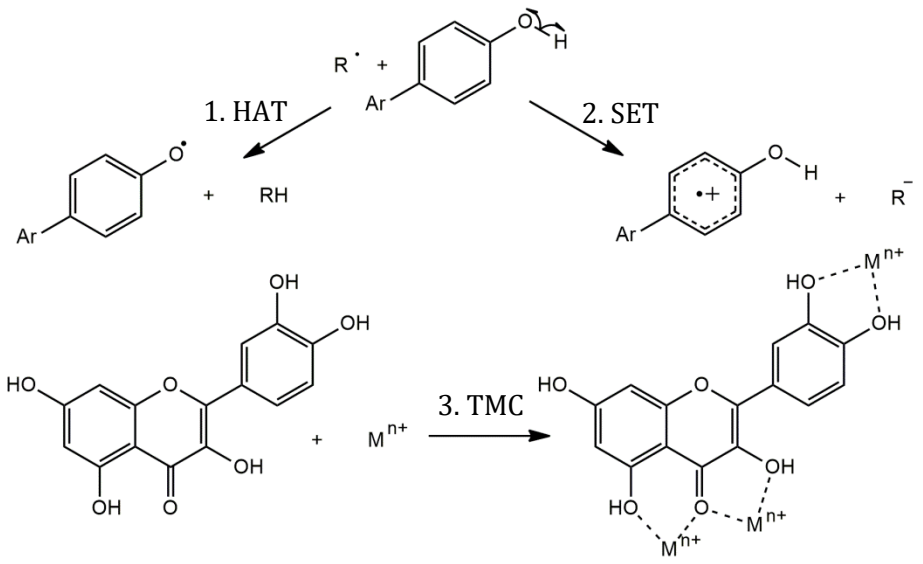


Схема 2.10. Механизми (HAT, SET и TMC) антиоксидативне активности полифенола[175]

Када се говори о антиоксидативној активности фенолних једињења, најчешће се као пример узимају флавоноиди, као изузетно моћни антиоксиданти. Ништа мање активне су и фенолне киселине и њихови деривати. Ова група једињења представља изузетне хелирајуће агенсе и „хватаче“ слободних радикала са посебним афинитетом за супероксид анјоне, пероксил и хидроксил радикале и пероксинитрите.[161]

Хелирајућа способност фенолних једињења, опет се истичу флавоноиди, има и своју „контраверзну“ страну. Под одређеним условима, флавоноиди, али и многи други такозвани антиоксиданти, могу утицати на оксидацију других супстанци и тако деловати као *прооксиданти*. Као што је већ познато, прооксиданти су једињења која индукују оксидативни стрес преко формирања реактивних врста или инхибирања функције антиоксидативних система.[142,173] Иако је прооксидативна активност повезана са слободним радикалима, доказано је да и неки антиоксиданти поседују прооксидативне особине. У тој групи су се нашли и флавоноиди и друга фенолна једињења. Они делују као прооксиданти у присуству прелазних метала, као што су гвожђе и бакар, тако што их редукују и повећавају њихову способност да формирају слободне радикале из пероксида.[177] Директна прооксидативна активност флавоноида је концентрационо зависна, али је и директно пропорционална укупном броју хидроксилних група у молекулу флавоноида, посебно на B прстену. Већи број OH група утиче на већу производњу хидроксил радикала у Фентоновој реакцији. Други начин прооксидативног деловања флавоноида јесте оксидација са флавоноидним феноксил радикалом, који представља крајњи производ у процесу „хватања“ слободних радикала. Феноксил радикал може бити подвргнут даљој оксидацији до флавоноидног хинона који може бити стабилизован. Међутим, феноксил радикал, у присуству велике количине прелазних метала, може ступити у интеракцију са молекулским кисеоником стварајући хинон и супероксид радикал-анјон (*Схема 2.11.*). Други видови прооксидативног деловања флавоноида су њихова оксидација пероксидазама, оксидација нискомолекуларних антиоксиданата и директно оштећење ДНК.[142,172,177,178]

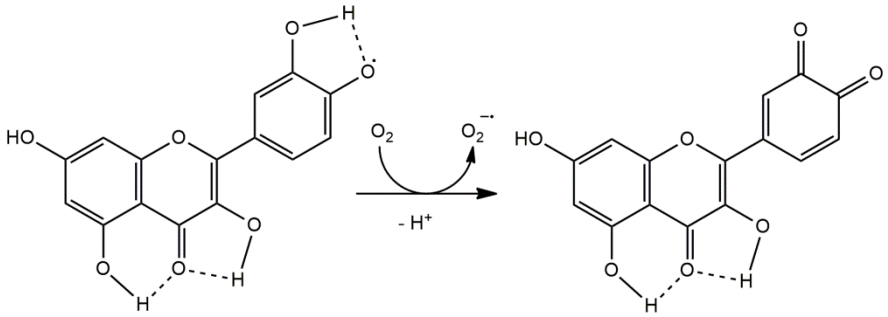


Схема 2.11. Прооксидативна активност флавоноида[142,176]

Флавоноиди и други феноли не могу се посматрати само као антиоксиданти, јер изазивају и штетне ефекте у организму, али ипак њихови прооксидативни ефекти не би требало да се означе као токсични. Прооксидативни ефекат може бити и позитиван, јер мала доза оксидативног стреса може подићи ниво сигнализације ћелија, антиоксидативне одбране и ксенобиотичких ензима, што води до свеукупне заштите ћелија (посебно у малигним стањима). Свакако је у научном смислу неопходно утврдити оптималну концентрацију ових једињења како би били у могућности да испоље све своје позитивне ефекте у потпуности.[142,161,179]

2.5. Лековите биљке као извори антимикробних супстанци

Микробне инфекције представљају велики проблем модерног друштва. Постојаност бактерија у окружењу и њихова интеракција са људима су кључни фактори развоја већине инфекција и болести.[180] И фунгалне инфекције су један од честих и значајних проблема повезаних са свакодневним животом. Токсичност коју оне изазивају у великој мери може утицати на здравље и нормално функционисање организма.[181]

Откриће антибиотика пеницилина у XX веку (1928. године), антимикотика амфотерицина Б (1956. године) и значајан напредак у развитку антимикробних супстанци и третману инфекција допринели су очувању људског здравља. Међутим, продужена употреба антибиотика и антимикотика довела је до адаптације микроорганизама, што је резултирало појавом резистентности (*енг.* „multidrug resistance“ – MDR), односно отпорности патогена на деловање антимикробног агенса. Најпознатији и, уједно, најотпорнији случај резистентности је MRSA (метицилин резистентни *Staphylococcus aureus*) који изазива озбиљне инфекције, посебно у болничким условима. Поред тога, рационалним дизајном лекова не добија се баш увек ефикасно антимикробно средство. Иако је сам дизајн лека успешан, дешавало се да предвиђена антимикробна активност у живом организму буде минимална, вероватно због сложених система преузимања агенса од стране ћелија.[143,181]

Из наведених разлога је потреба за новим, ефикасним антимикробним једињењима довела до свеобухватијег и темељнијег проучавања природних извора, у првом реду, проучавања антимикробне активности лековитих биљака, њихових етарских уља, екстраката и изолованих једињења. Биљке поседују способност синтезе широког спектра једињења која, између осталог, имају улогу у заштити биљке од патогених инфекција (фитоалексини – антимикробне компоненте које захтевају *de novo* експресију ензима укључених у њихову биосинтезу након деловања патогеног агенса; фитоантиципини – нискомолекуларне антимикробна једињења присутна у биљци пре напада патогена или су продуковани након инфекције само од већ постојећих молекула).[182] Још од давнина, у традиционалној медицини бројних народа познато је антимикробно деловање многих биљних врста на људски организам, нпр. босиљка (*Ocimum basilicum*), оригана (*Origanum vulgare*), рузмарина (*Rosmarinus offinicalis*), жалфије (*Salvia officinalis*), тимијана (*Thymus vulgaris*), белог лука (*Allium sativum*) и першуна (*Petroselinum crispum*). Ове биљке су, уствари, чиниле свакодневну антимикробну „терапију", јер су се користиле у облику чајева, али и као зачини јелима. Лековито биље додато храни, не само што побољшава сам укус и остале органолептичке особине, већ и спречава развијање микроорганизама у намирницама, а тиме и њихово кварење.[183] Антимикробна активност многих биљних врста (у облику екстраката, инфуза, декокта, етарских уља), као и једињења изолованих из биљака, је научно потврђена. Предност коришћења ових препарата и једињења у терапеутске сврхе је управо у томе што они не испољавају пропратне нежељене ефекте који су најчешће повезани са синтетичким хемикалијама. Такође, још увек није документована појава резистентности микроорганизама на фитопрепарате, највероватније због њиховог вишеструког механизма деловања.[180]

Ако се фокусирамо на бактеријске инфекције, постоје два основна типа антибактеријског деловања супстанци, а то су бактерицидно и бактериостатско деловање. Бактерицидна активност карактерише се иреверзибилним оштећењем виталних ћелијских структура, док бактериостатици заустављају раст и размножавање бактерија. Ови ефекти условљени су концентрацијом и успешном интеракцијом антибиотика са циљаним местом деловања, док присуство теже пропустљивог липополисахаридног слоја (LPS) у ћелијском зиду Грам-негативних бактерија (у односу на Грам-позитивне где LPS изостаје) може бити фактор смањеног деловања антибиотика.[184]

У фитојединења која испољавају антимикробне ефекте убрајају се терпеноиди, алкалоиди, лектини, полипептиди и различите групе фенолних једињења.[185] У односу на своју хемијску структуру, ова једињења испољавају широк спектар механизама антимикробног деловања. Основни механизми антибактеријског деловања (*Слика 2.15.*), које поседују синтетичка и фитојединења су:

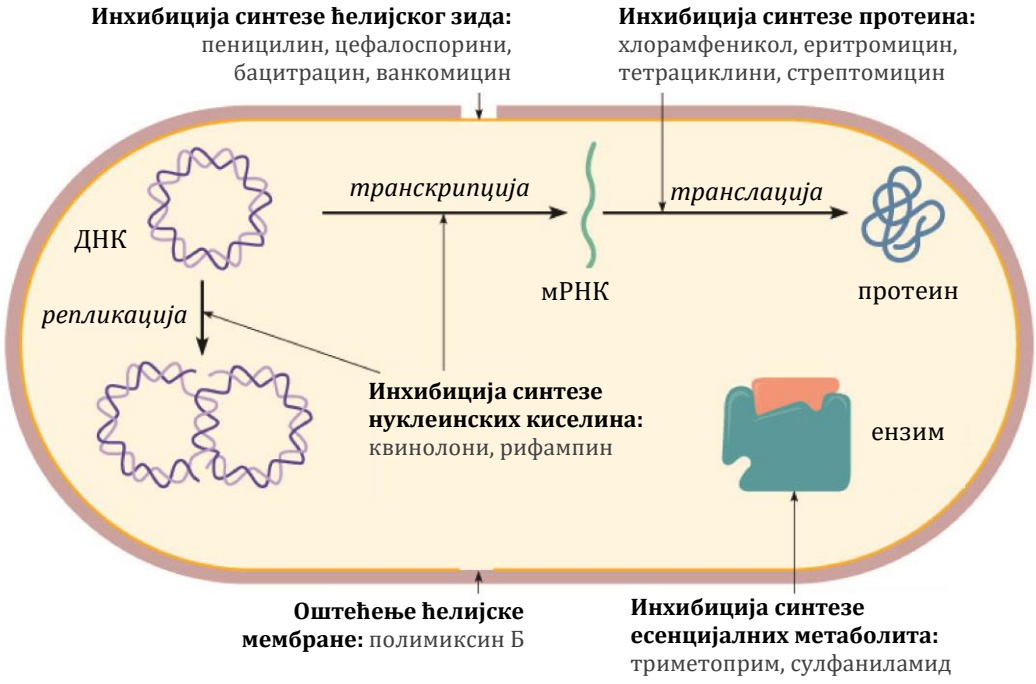
1. Инхибиција синтезе ћелијског зида. Група антибиотика делује на спречавање синтезе пептидогликана присутних само у бактеријским ћелијским зидовима, ћелијски зидови постају слабији и на крају долази до лизе ћелије. Што се тиче сложеног ћелијског зида гљива, места на које антимикотици делују су хитини и глукани и процес

њихове синтезе, узрокујући смањење структурног интегритета и осмотске стабилности ћелије патогених гљива.

2. Оштећење ћелијске мембране. Група антимикробних агенаса делује тако што утиче на повећање пропустљивости ћелијске мембране бактерије или гљиве, смањење продукције АТР-а, деполаризацију мембранског потенцијала, условљавајући излазак ћелијског садржаја у спољашњу средину. Већина антифунгалних агенаса делује тако што инхибира биоситезу ергостерола (главног стерола ћелијске мембране плесни и квасаца) или директно интерагује са ергостеролом у ћелијској мембрани гљива

3. Инхибиција синтезе нуклеинских киселина. Бројни антибиотици утичу на процес синтезе ДНК у фазама репликације и транскрипције у микроогранизму. Они интерагују са два кључна ензима у бактеријској ћелији, ДНК гиразом и ДНК топоизомеразом IV и инхибирају ензимски пут синтезе фолата у бактеријској ћелији.

4. Инхибиција синтезе протеина. Структура рибозома у бактеријској прокариотској ћелији (70s) утиче на селективну токсичност неких антибиотика који се могу везати на 30s или 50s подјединицу рибозома изазивајући прекид транслације и синтезе протеина.[180,186,187]



Слика 2.15. Механизми антимикробног деловања на бактеријску ћелију[186]

Поред већ наведених основних механизама постоје и други механизми на основу којих биљке и једињења биљног порекла испољавају своју антимикробну активност. Један од тих механизама је антибиофилм активност, односно способност спречавања формирања биофилма који представља екстрацелуларну полимерну супстанцу коју граде бактеријске ћелије и која се може адхезирати на различите

површине. Многе супстанце природног порекла контролишу овај процес, нарочито код бактеријских врста *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*. Инхибиција синтезе бактеријске капсуле је још један начин одбране од бактеријских инфекција. Капсула штити бактерију од од фагоцитозе и повећава опстанак бактерија унутар домаћина, а такође има утицај при формирању биофилма. Многа једињења имају особину да повећавају осетљивост, односно смањују резистентност, бактерија према синтетичким антибиотицима. Нека једињења смањују вирулентност бактерија тако што утичу на ћелијску сигнализацију и спречавају експресију вирулентних гена у микробу. Даље, она могу редуковати производњу бактеријских егзо- и ендотоксина и микотоксина, а имају и многе позитивне утицаје на имуни систем домаћина и гастроинтестиналну микрофлору.[180]

Структурни диверзитет и конфигурација хемијских једињења биљног порекла има велики утицај на механизам антимикробног деловања. Присуство хидроксилне (–OH) групе у фенолним једињењима доводи до интеракција са ћелијском мембраном бактерије узрокујући промену структуре и излазак ћелијског садржаја. Такође, активне –OH групе утичу на делокализацију електрона, при чему дејствују као измењивачи протона и редукују градијент протока H^+ јона кроз цитоплазмину мембрану бактерија што доводи до смрти ћелије, а могу интерферирати и са метаболичким реакцијама микробних ћелија. Поред броја и супституисаности ароматичног прстена –OH групама, број двоструких веза и дужина бочног ланца имају утицаја на антимикробну ефикасност фенолног једињења. Додатан утицај на повећање антимикробне активности фенолних једињења може имати увођење алкил или алкенил група.[188,189] Флавоноиди, као једна од најприсутнијих група фенолних једињења у биљкама, имају изражену антимикробну активност на панеле бактеријских и фунгалних патогена. Неки од њих се у самој биљци синтетишу као одговор на напад микроорганизама. Њихова активност је најпре базирана на способности да граде комплексе са екстрацелуларним и растворљивим протеинима и ћелијским зидом бактерија, док липофилнији флавоноиди интерагују са ћелијском мембраном утичући на пропустљивост и пуцање мембране. С друге стране, друга група фенолних једињења, танини, граде комплексе са протеинима помоћу водоничних веза, хидрофобних ефеката и ковалентних веза и тако утичу на инактивацију микробних адхезина, ензима и транспортних протеина. Такође, танини се могу комплексирати са полисахаридима у ћелијском зиду. Због ових особина танини могу бити токсични за многе квасце, бактеријске и гљивичне врсте.[180,185]

Све наведене чињенице које подржавају антимикробни потенцијал биљака и фитоједињења поткрепљене су чврстим научним доказима. У модерном добу истраживања нових ефикаснијих антимикробних супстанци, фитоједињења играју пресудну улогу у развоју активних терапеутика, самостално или у комбинацији са конвенционалним антибиотицима и антимикотицима. Особине које фитоједињења морају имати како би се користила у терапеутске сврхе јесу ниска минимална инхибиторна концентрација (MIC), ниска токсичност, висока биолошка доступност и безбедна употреба за животиње и човека.[180,183]

2.6. Инфламација и антиинфламаторна активност лековитих биљака

Инфламација (запаљење) представља заштитини одговор организма који осигурава уклањање штетних стимуланаса, као што су страна тела (бактерије, паразити и вируси), али и процес који утиче на исцељење и репарацију оштећеног ткива. Инфламација је проузрокована бројним факторима, као што су микробне инфекције, озледе ткива и инфаркт миокарда.[190] Организам сисара, суочен са неким од ових утицаја може активирати низ одбрамбених одговора, а њихов развој изазива акутну запаљенску (имуну) реакцију. Управо одбрамбени одговори представљају заштитну реакцију на иритације, повреде или инфекције које се карактеришу црвенилом, температуром, отоком, губитком ткивних функција и болом. Црвенило (*rubor*) и повишена температура (*calor*) су повезани са повећањем протока крви, отоци (*tumor*) настају услед повећања васкуларне пермеабилности, а бол (*dolor*) је последица активације и надражаја примарних нервних влакана.[191,192] Постоје различити случајеви у којима се може покренути одбрамбени одговор организма (оштећења проузрокована УВ зрачењем, топлотом, хемијским агенсима, поленом, у аутоимуним стањима), па у том случају сам одговор може проузроковати оштећења и тиме чини део процеса развоја обољења. У оваквим стањима користе се антиинфламаторни или имуносупресивни лекови.[193,194] Велики је број обољења у чијој основи лежи процес инфламације, а нека од њих су реуматоидни артритис, псоријаза, атеросклероза, различите алергије, хроничне инфламаторне болести плућа (астма), улцеративни колитис, Кронова болест, дијабетес типа 2, нефропатија, неуродегенеративне болести (Алцхајмерова болест, мултипла склероза) и канцер.[195,196]

Разумевање молекуларних и ћелијских механизама укључених у процес запаљења значајно се повећало у последњих неколико декада, што је свакако условило и откривање многих могућности за развијање нових лекова за третирање хроничних инфламаторних обољења. Откривено је да велики број медијатора (посредника) запаљења могу имати улогу специфичних мета које би узроковале ослобађање других медијатора из леукоцита и додатно привлачење леукоцита, као што су неутрофили, на само место запаљења.[191] Константан прилив нових информација и открића на пољу имунохистохемије, биохемије, молекуларних и животињских модела, уз клиничке студије, знатно је повећао интересовање за проучавање механизама који леже у основи запаљенског процеса. Иако је последњих година откривен велики број медијатора запаљења, тачна улога појединих медијатора још увек није довољно разјашњена.[193]

Сви медијатори запаљења могу се сврстати у неколико категорија, у односу на механизам и место њиховог деловања. Сходно томе, дефинисане су четири групе медијатора, и то:

1. *Локални хормони као инфламагени и медијатори* – агенси који први ступају у реакцију при локалној озледи, управо због тога што се формирају или ослобађају *in situ* и њихова активност је често прилично краткотрајна. Изузетно су значајни код озледе ткива у стањима хроничног запаљења (простагландини, хепарин, аденилати (cAMP, ADP), хистамин, серотонин, кинини, катехоламини).

2. *Макромолекулски медијатори запаљења* – На местима где долази до активне деструкције ткива може бити детектована читава породица литичких ензима (колагеназе, нуклеазе и ензими који делују на протеин-полисахаридне комплексе) који могу ослободити различите активне компоненте из њихових инактивних прекурсора, могу изазвати хомеостазу, иницирати агрегацију тромбоцита, повећавати васкуларну пермеабилност или иницирати ослобађање других медијатора.

3. *Ћелијски медијатори запаљења* – Све класе леукоцита се могу сврстати у потенцијалне медијаторе запаљења. Леукоцити учествују, не само у каснијим, већ и у почетним знацима инфламације. Примарна разлика између акутног и хроничног запаљења је у томе да се код првог моноцити акумулирају тако што улазе из циркулације а потом нестају, док код другог моноцити се деле *in situ* и континуирано се накупљају на месту повреде. Заједничка особина различитих врста леукоцита је да су они покретне резерве медијатора запаљења.

4. *Компоненте ткива* – Ткиво може поседовати велике резерве релативно краткоживећих, али и дугоживећих инфламагена.[193]

Еикозаноиди представљају једну од најзначајнијих група медијатора инфламације. Они су међу најмоћнијим регулаторима ћелијских функција и производе се у скоро свакој ћелији у организму. Еикозаноиди делују првенствено као локални (паракрини) хормони, утичу на ћелије које их производе, као и на ћелије у окружењу. Ови деривати масних киселина поседују веома значајне улоге у организму, учествују у многим процесима, а пре свега у имуном одговору (запаљење, бол и грозница) који настаје услед инфекција или повреда. Поред тога, учествују и у регулисању контракција глатких мишића (интестиналних и мишића утеруса), у репродуктивној функцији, у секрецији желудачне киселине, у формирању крвних угрушака и регулисању крвног притиска, повећавају екскрецију воде и натријума преко бубрега.[197,198] Сви еикозаноиди се добијају из арахидонске киселине (Δ-*cis*-5,8,11,14-еикозитетраенска киселина), полинезасићене масне киселине која садржи 20 C-атома, од које и потиче њихов назив (*грч.* „eikosi" – двадесет).[198] Арахидонска киселина се налази у ћелијским мембранама, естерификована у мембранским фосфолипидима. Како се у организму не може синтетисати *de novo,* једино је могуће уносити је путем исхране која садржи арахидонску киселину или је богата масним киселинама из којих се арахидонска киселина може синтетисати (линолна и линолеинска киселина). Компоненте које служе као сигнали за синтезу еикозаноида везују се за мембранске рецепторе и активирају фосфолипазе које кидају везу између незасићених масних киселина и глицерола у мембранским фосфолипидима (*Схема 2.12.*).[197,199]

Постоје три класе еикозаноида који се синтетишу као крајњи производи метаболизма арахидоната: простагландини (PG), тромбоксани (TX) и леукотриени (LT). Све наведене групе еикозаноида су физиолошки и фармаколошки изузетно активне, делују као локални хормони и преко Г-протеин-везаних рецептора испољавају своје биохемијске ефекте.[198,200] Као што је приказано на *Схеми 2.12.*, арахидонска киселина је прекурсор за синтезу свих група еикозаноида. Она се у организму метаболише преко 3 велика ензимска пута од којих су два детаљно проучена и то, пут

циклооксигеназе (у коме настају PG и TX) и пут липоксигеназе (у коме настају LT). Пут преко цитохрома P450 води до настанка еикозаноида са недефинисаном физиолошком функцијом. Арахидонска киселина се из липидног двослоја ћелијских мембрана ослобађа под утицајем фосфолипаза A_2 или Ц које су везане за мембрану. Сама активација ензима последица је интеракције специфичних мембранских рецептора са медијаторима запаљења (хистамин, цитокини, брадикинин, епинефрин, тромбин, ангиотензин II). Након што бива ослобођена у цитосол, арахидонска киселина подлеже метаболичким реакцијама преко три наведена пута.[197]

Пут циклооксигеназе (биосинтеза простагландина и тромбоксана): Ослобађање арахидоната и синтеза или интерконверзија еикозаноида може бити иницирана различитим агенсима, као што су хистамин, хормони (епинефрин и брадикинин), протеазе (тромбин), па чак и албумин из серума. Главни покретач синтезе еикозаноида је повреда ткива и инфламаторна реакција. Када дође до оштећења ткива, инфламаторне ћелије, моноцити и неутрофили, се накупљају око повређеног ткива и интерагују са околним ћелијама, што води до ослобађања арахидоната и синтезе еикозаноида.[199] Простагландини (PG) садрже петочлани угљеников прстен који потиче од ланца арахидонске киселине. PG су први пут изоловани из ткива простате, па отуда и потиче сам назив. У почетку су дефинисане две групе PG и то, PGE-растворљиви у етру и PGF-растворљиви у фосфатном пуферу. Свака група садржи бројне подтипове (PGE_1, PGE_2 итд.). PG делују у многим ткивима тако што регулишу синтезу интраћелијског цикличног аденозин-монофосфата (cAMP). cAMP је медијатор у реакцијама различитих хормона, па сами простагландини утичу тако на велики број ћелијских и ткивних функција, стимулишу контракције глатких мишића утеруса, утичу на проток крви до органа, подстичу одговор ткива на дејство хормона или повећавају телесну температуру, узрокују запаљење и бол. Тромбоксани (TX) поседују шесточлани прстен који садржи етарску функционалну групу. Производе их тромбоцити и делују на стварање крвних угрушака и смањење протока крви на месту згрушавања. Постоје три типа PG и TX, добијени из еикозитетранеске киселине (1. серија), добијени из еикозипентаенске киселине (3. серија), али најзначајнији у организму најзаступљенији су они добијени из арахидонске киселине (2. серија: PGE_2, PGI_2, TXA_2).[198,200]

Биосинтеза простаноида укључује коришћење два молекула кисеоника и иницирана је ензимом повезаним са ендоплазматским ретикулумом, простагландин ендопероксид синтетаза, познатим и као циклооксигеназа (COX). Циклооксигеназа постоји у два изоензимска облика, COX-1 и COX-2. Овај ензим катализује симултану оксидацију и циклизацију арахидонске киселине при чему настаје петочлани прстен и додаје се 4 атома кисеоника (два између C9 и C11 атома, и два на C15 атом), при чему настаје нестабилни ендопероксид PGG_2. Хидропероксигрупа на C15 се брзо редукује помоћу пероксидазе до хидроксилне групе, формирајући други ендопероксид, PGX_2.[199]

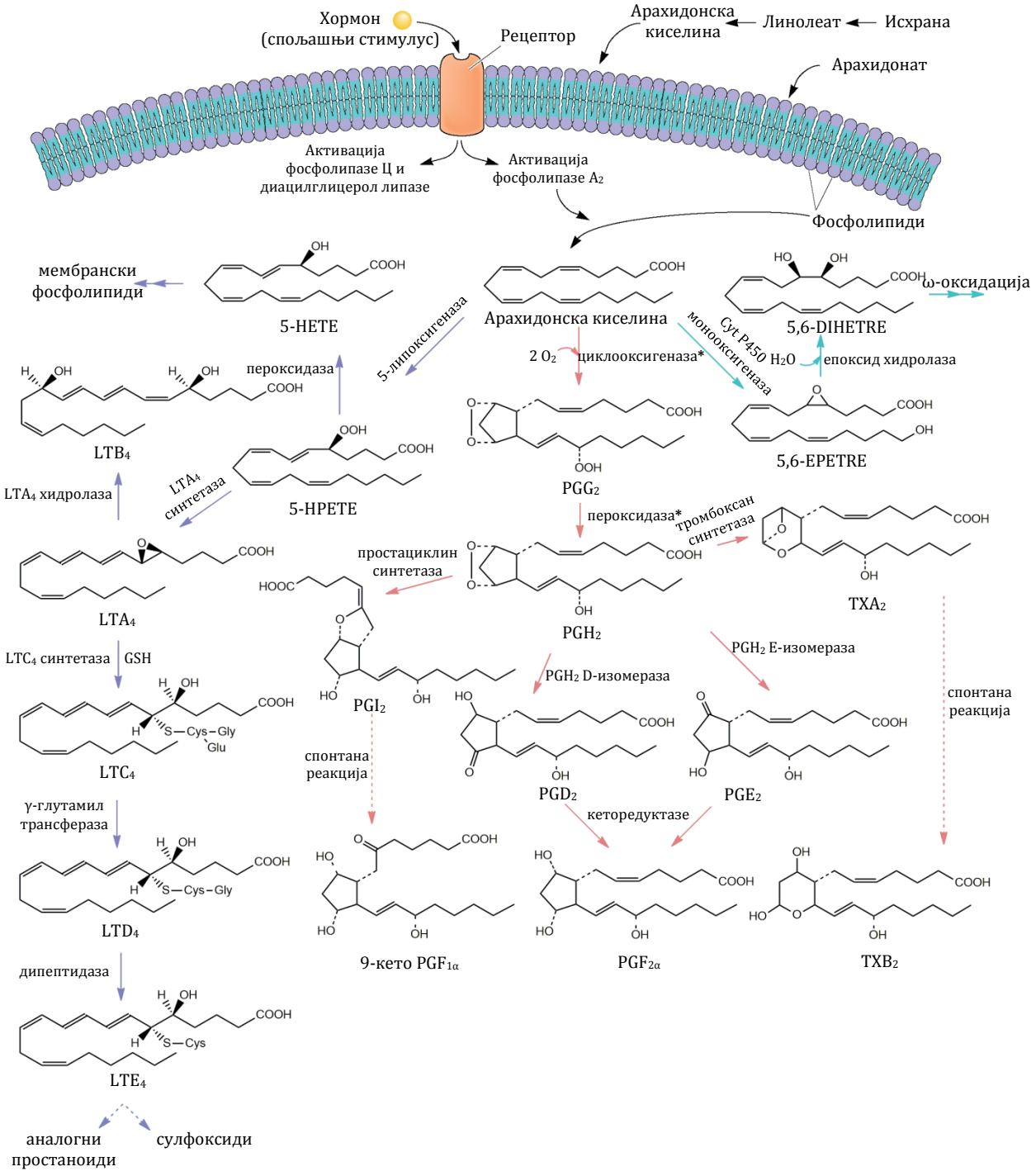


Схема 2.12. Метаболизам арахидонске киселине и синтеза простагландина (PG), тромбоксана (TX) и леукотриена (LT). Плавом бојом је означен пут цитохрома P-450, розе боја представља пут циклооксигеназе, а љубичастом бојом приказан је липоксигеназни пут.

Следећи корак је изузетно специфичан, у зависности од типа ћелија које су укључене, PGX_2 може бити редукован специфичним изомеразама до PGE_2 или PGD_2 (PGE синтетаза и PGD синтетаза). PGE_2 се може даље редуковати PGE 9-кеторедуктазом до $PGF_{2\alpha}$. $PGF_{2\alpha}$ се такође може добити директно из PGX_2 под утицајем ендопероксид редуктазе. PGX_2 се може превести у тромбоксан TXA_2, а реакција је катализована TXA синтетазом. Овај ензим је присутан у тромбоцитима у великој концентрацији. У васкуларном ендотелу међутим, PGX_2 се помоћу PGI синтетазе преводи у простагландин PGI_2 (простациклин). TXA_2 и PGI_2 имају изузетно значајан биолошки антагонистички утицај на вазомоторне и глатке мишиће и агрегацију тромбоцита. Сваки биолошки активан простагландин има OH-групу на положају 15, двоструку везу између C13 и C14 и различите супституенте на прстену. Неки имају и више двостуких веза што је приказано арапским бројем у називу простагландина. Тромбоксани по структури врло подсећају на простагландине, с тим што поседују шесточлани прстен са кисеониковим атомом. Најчешћи је тромбоксан TXA_2, који садржи додатни кисеоник C9 и C11 атому у прстену. Простагландини и тромбоксани могу бити врло брзо инактивирани. Њихово време полуживота ($t_{1/2}$) креће се од једне секунде до неколико минута. Простагландини се инактивирају оксидацијом 15-OH групе, неопходне за њихову активност, у кето форму. Двострука веза на C13-атому се редукује. Затим долази и до β- и ω-оксидације делова ван прстена, при чему настају дикарбоксилне киселине које се излучују урином. Активни TXA_2 се брзо метаболише до TXB_2 цепањем кисеоничног моста између C9 и C12 атома, при чему настају две OH-групе. TXB_2 нема биолошку активност.[197]

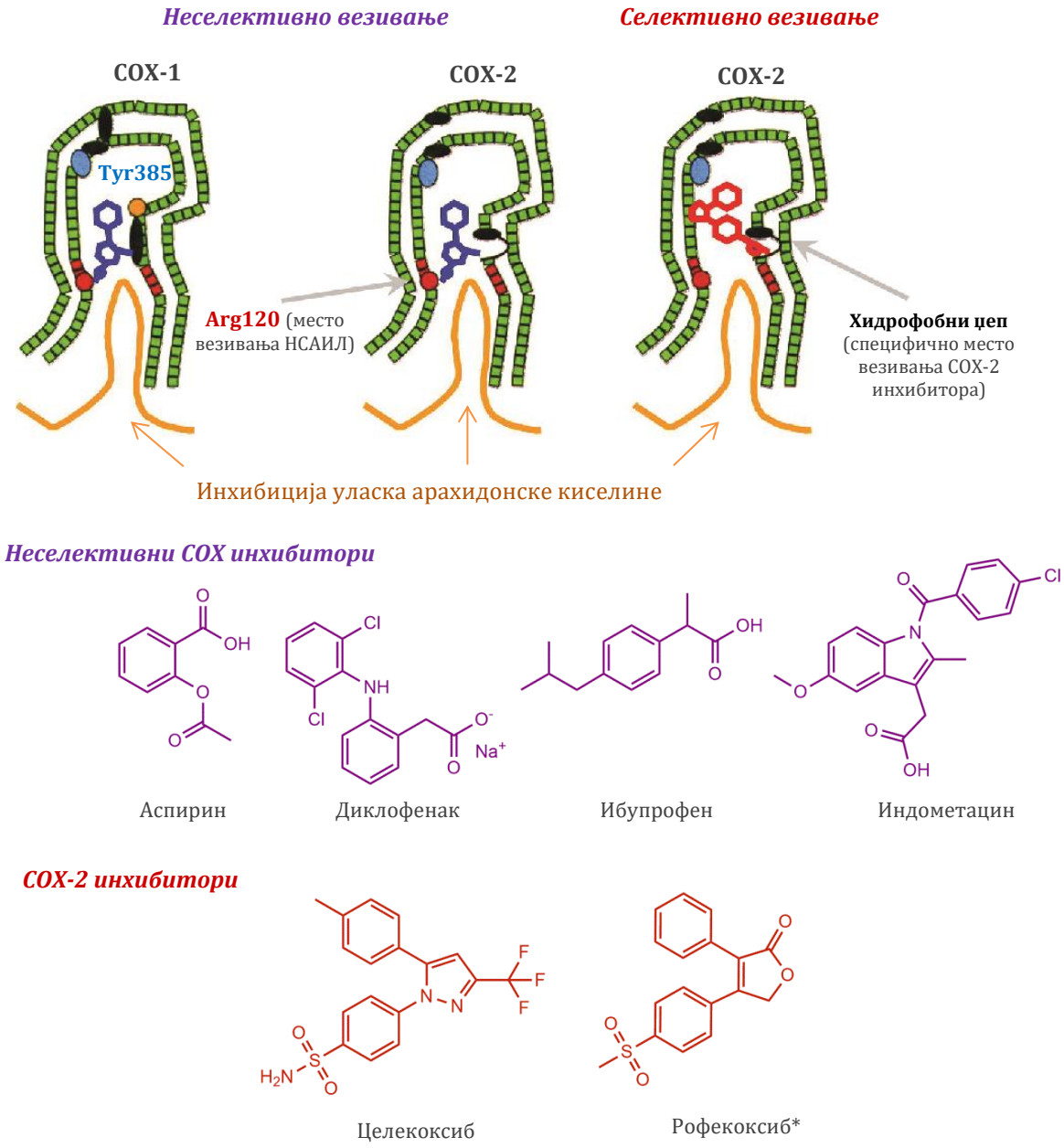
Пут липоксигеназе (биосинтеза леукотриена, HETE и липоксина): Поред тога што арахидонска киселина представља супстрат за пут циклооксигеназе, она је такође супстрат у оквиру пута липоксигеназе (LOX), где се као крајњи производи добијају леукотриени и липоксини. Леукотриени представљају породицу конјугованих триена насталу из еикозаноидне киселине у леукоцитима, мастоцитима, тромбоцитима и макрофагима у путу липоксигеназе, као одговор на имунолошке и неимунолошке стимулансе.[200] Они су биолошки врло моћни сигнални молекули (леукотриен D_4 индукује контракције мишића дисајних путева). Липоксини индукују хемотаксу леукоцита (усмерено кретање ћелија) и стимулишу синтезу супероксид анјона у њима.[198] Ензими липоксигеназе катализују везивање молекула кисеоника на C-атом који гради једну од двостуких веза при чему настаје хидропероксилна (–OOH) група на том положају. Услед оксидације долази до изомеризације двостуке везе из *cis* у *trans* конфигурацију, а затим се нестабилна –OOH група преводи у стабилнију хидроксилну групу.[197] Три различите липоксигеназе (диоксигеназе) могу увести кисеоник на 5, 12 и 15 положаје арахидонске киселине (LOX-5, LOX-12 и LOX-15), при чему се формирају хидропероксиди. Само LOX-5 води до настанка леукотриена. Липоксини су породица конјугованих тетраена који такође настају у леукоцитима и то комбинованим деловањем више LOX ензима.[200]

Као што је приказано на *Схеми 2.12.*, синтеза леукотриена почиње формирањем хидропероксиеикозитетраенских киселина (HPETE). Ови производи се даље, или редукују до одговарајућих хидрокси метаболита (HETE), или се метаболишу до леукотриена и липоксина. Деловањем LOX-5 добија се 5-HPETE која се преводи до епоксида, леукотриена A_4 (LTA_4). Број 4 се односи на присуство четири двостуке везе у леукотриену. Три од њих су конјуговане (7, 9 и 11) и формирају триен. Остали функционални леукотриени се добијају из LTA_4 преко два пута. У првом случају, LTA_4 се конвертује у LTB_4, 5,12-дихидрокси дериват. У другом, долази до адиције редукованог глутатиона на C6-атом и настаје LTC_4, катализовано глутатион S-трансферазом. Глутамат се уклања из остатка глутатиона у LTC_4 у реакцији катализованој γ-глутамил транспептидазом и настаје LTD_4. Даље, дипептидаза цепа остатак глицина из LTD_4 па настаје LTE_4. Липоксини се формирају преко реакције катализоване LOX-15, праћеном дејством LOX-5 на арахидонску киселину. Серијом редукција долази до формирања хидроперокси групе, а потом и настанка трихидрокси деривата арахидонске киселине – липоксина.[197]

Нестериодни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ) су међу највише коришћеним лековима у третманима инфламаторних процеса широм света. НСАИЛ поседују различите хемијске структуре (*Слика 2.16.*), али углавном имају три главна дејства: *антиинфламаторно дејство* – инхибицијом ензима простагландин синтетазе и циклооксигеназе долази до смањења синтезе вазодилататорних простагландина (PGE_2 и простациклин), што утиче на смањење вазодилатације и индиректно смањење едема, при чему акумулација инфламаторних ћелија није смањена; *аналгетско дејство* – смањење стварања PG утиче на смањење сензитизације нервних завршетака од стране медијатора запаљења, а отклањање бола и главобоље резултат је смањења вазодилатације изазване простагландинима; *антипиретички ефекат* – инхибирају синтезу PGE_2, резултат је смањена количина PG који су одговорни за повећање телесне температуре у току инфламације.[201] Нажалост, ови лекови делују само симптоматски, немају утицаја на прогресију саме болести.[193] Данас је на тржишту присутно преко 50 различитих НСАИЛ, али ни један од њих се не може сматрати идеалним леком у контроли и ублажавању знакова и симптома запаљења, а неки чак могу имати и значајне нежељене ефекте на организам, изазивају болове у стомаку, улцерозна стања, горушицу, главобољу и вртоглавицу, повећавају склоност ка крварењу, доводе до алергијских реакција и проблема у нормалној функцији јетре и бубрега.[202–204]

Већина антиинфламаторних ефеката НСАИЛ у вези је са њиховим инхибиторним дејством на ензим арахидонску циклооксигеназу, а тиме на инхибицију синтезе еикозаноида (PG и TX). Деведесетих година двадесетог века утврђено је да постоје два изомерна облика ензима COX: COX-1 присутан је у већини ткива и одговоран је за нормалну физиолошку продукцију простагландина и тромбоксана, и COX-2 чија активност је индукована цитокинима, митогенима и ендотоксинима у инфламаторним ћелијама, а одговоран је за продукцију PG у току инфламације.[206] Трећа изоформа овог ензима, COX-3, недавно је идентификована као једна варијанта COX-1 облика. Иако је активност COX-2 доминантан фактор у процесу производње простагландина у току

инфламације, постоје неки наводи да оба изо-облика (COX-1 и COX-2) доприносе акутном имуном одговору.[192]



Слика 2.16. Начин деловања и најчешће коришћени нестероидни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ)[14,202,205] ** Повучен из употребе.*

Стуктура COX ензима састоји се из три домена, при чему је трећи каталитички домен глобуларне структуре и садржи активне центре циклооксигеназе и пероксидазе.[197,199] Активни центар COX лежи на крају дугачког, уског, хидрофобног тунела или канала где лежи каталитички значајан остатак Tyr385. Активност пероксидазе је имплицирана формирањем Tyr385 радикала који је неопходан за активност COX. Аспирин и други НСАИЛ (*Слика 2.16.*) блокирају синтезу простагландина попуњавањем и блокирањем тунела, спречавајући миграцију арахидонске киселине до Tyr385

на активном центру на крају тунела.[199] Постоји барем четири различита механизма деловања НСАИЛ. Аспирин ковалентно модификује (О-ацетилује) Ser530 остатак у тунелу, и тако иреверзибилно инактивира и COX-1 и COX-2. Ибупрофен делује тако што се реверзибилно такмичи за место везивања супстрата у тунелу. Индометацин узрокује спору, временски зависну инхибицију COX-1 и COX-2, преко формирања соног моста између карбоксилата и Arg-120 који лежи у тунелу. Неки лекови, као што су целекоксиб (Celebrex) и рофекоксиб (Vioxx), делују четвртим механизмом, специфично инхибирајући активност COX-2.[207]

Многа једињења која су специфични COX-2 инхибитори развијана су за терапеутску примену јер се сматрало да селективно блокирају запаљење узроковано дејством COX-2, без опасности од проузроковања било каквих гастроинтестиналних проблема и нежељених ефеката који настају због инхибиције ензима COX-1. Међутим, рофекоксиб је повучен са тржишта због значајног повећања ризика од срчаног и можданог удара.[202] То је само један од разлога усмеравања пажње научне заједнице ка откривању нових извора COX-2 инхибитора, са посебним фокусом на биљне изворе који показују аниинфламаторне особине, али без нежељених ефеката.[17,160,208]

Научна испитивања потврдила су повезаност инфламаторних процеса са развијањем многих хроничних обољења, као што су кардиоваскуларна и неуродегенеративна обољења, метаболички поремећаји, као и развијање тумора и канцерогених обољења. Велики број епидемиолошких и експерименталних испитивања показала су да усмеравање инфламаторног одговора у присуству природних фитојединења игра значајну улогу у превенцији, ублажавању и лечењу многих хроничних болести, посебно учесталости кардиоваскуларних обољења и канцера код којих је забележена највећа стопа морталитета.[159,160] Антиинфламаторну активност поседује велики број фитојединења (фенолна једињења, алкалоиди, терпеноиди), од којих је најзначајнија и највише испитивана група флавоноидних једињења. Истраживања су показала да исхрана богата флавоноидима утиче на смањење појаве хроничних болести и канцера, што се приписује, поред других биолошких активности, и антиинфламаторним ефектима.[159,160,209]

Флавоноиди утичу на различите фазе имуног одговора, од инфламаторних медијатора, различитих ензима, до ћелијских система. Они могу остварити антиинфламаторно деловање преко неколико механизама који укључују различите активности:

- „хватање“ слободних радикала и антиоксидативна активност;
- регулација функције ћелија укључених у инфламаторни процес (мастоцити, макрофаги, лимфоцити и неутрофили);
- регулација активности ензима који учествују у метаболизму арахидонске киселине (фосфолипаза A_2, циклооксигеназе, липоксигеназе) и индуцибилне азот оксид синтетазе - iNOS);
- регулација производње других проинфламаторних молекула;
- регулација експресије проинфламаторних гена.[159,209,210]

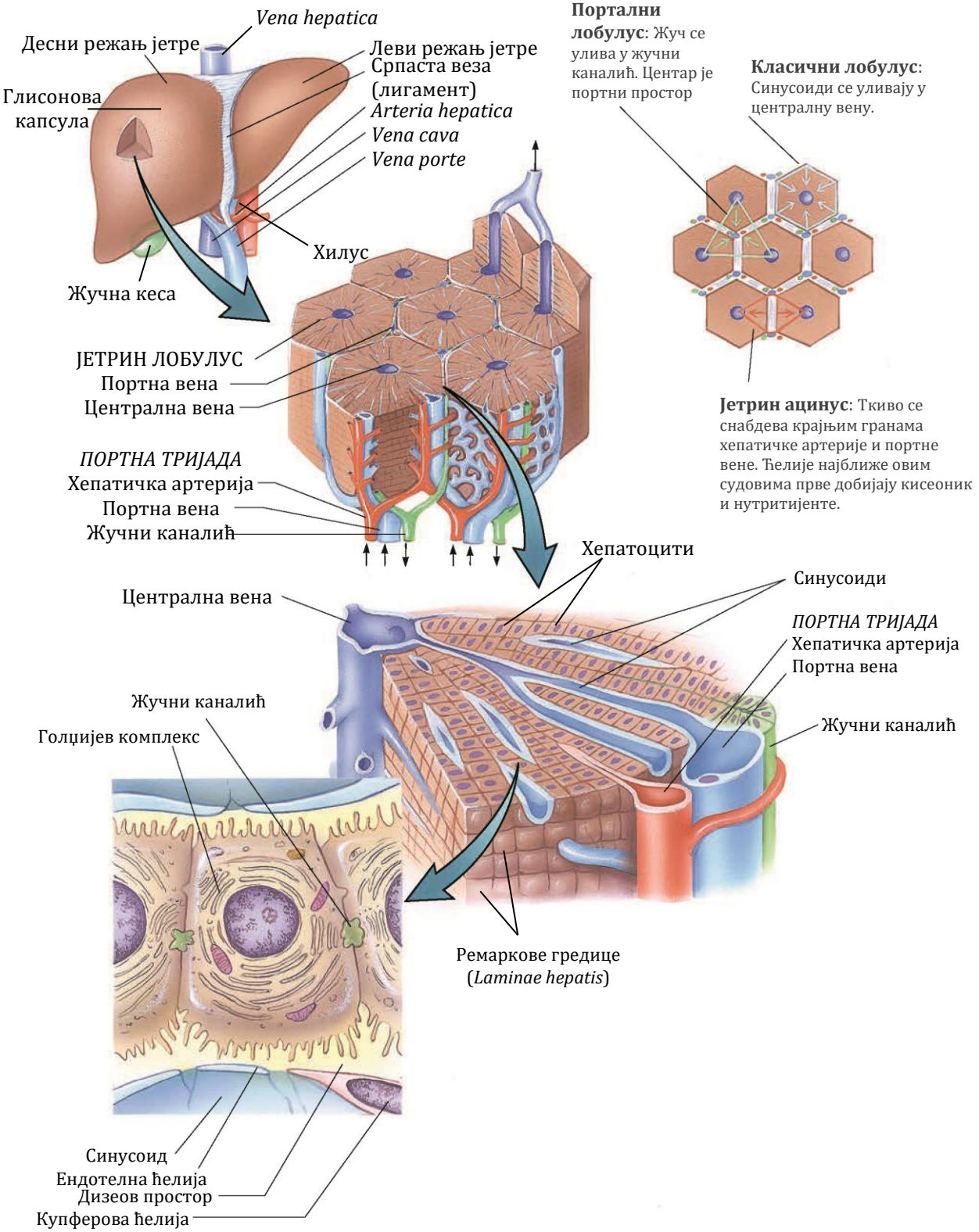
Многа фенолна једињења, нарочито флавоноиди, показала су антиинфламаторне и антиалергијске особине и у *in vitro* и у *in vivo* условима. Антиинфламаторна активност коју ова једињења испољавају може се објаснити на основу различитих механизама, не само једним начином деловања. Они највероватније бивају делотворни преко више механизама који утичу на многобројна места у ћелијском систему, као што је случај са кверцетином, апигенином, куркумином, капсаицином, ресвератролом и другим фенолним једињењима.[191,196,209,210] Што се тиче безбедности и начина примене фитопрепарата, најважније је одредити већ поменути мултикомпонентни механизам деловања, највишу дозвољену дозу и утврдити оправданост примене у инфламаторним стањима. Дакле, развити нову класу биљних препарата или чистих, изолованих једињења који су ефикасни и безбедни за примену у терапеутске сврхе, примарни су циљеви научних испитивања.[159,209]

2.7. Нефро- и хепатопротективни ефекти лековитих биљака

Јетра и бубрези су витални, дакле физиолошки изузетно важни органи. Како би се што боље разумео њихов значај, неопходно је рећи неколико речи о анатомским и физиолошким карактеристикама ових органа.

Јетра (*лат.* „*hepar*“, *Слика 2.17.*) представља највећу жлезду у човековом телу, тежине је око 1-1.5 kg и по величини је други највећи орган људског тела, после коже. Специфичан положај јетре у абдоминалној дупљи, испод дијафрагме, и у самом циркулаторном систему, омогућава јетри да буде посредник између дигестивног и васкуларног система. Јетра преузима и депонује хранљиве материје апсорбоване из црева и уједно врши трансформацију, неутрализацију и уклањање токсичних супстанци из крви. Анатомски гледано, структурне компоненте јетре су паренхимске ћелије зване хепатоцити које су поређане у облику плоча тзв. Ремаркових гредица (*laminae hepatis*), везивно-ткивна строма у којој се налазе крвни и лимфни судови, нерви и жучни канали, синусоидни капилари који се налазе између хепатоцитних плоча и два типа ћелија које су у контакту са капиларним зидом, Купферове и Ито (перисинусоидне) ћелије. Јетра је обавијена танком везивном капсулом (Глисонова капсула), разликују се два режња јетре (леви и десни), са доње стране налази се отвор – хилус где у јетру улазе портна вена и хепатичка артерија, а излазе жучни канал и лимфни судови. Као морфо-функционална јединица јетре може се узети класични лобулус (режњић) јетре, али и портални лобулус или јетрин ацинус. Класични лобулус састоји се од мреже паренхимских ћелија хепатоцита који представљају основну јединицу грађе јетре и крвних и жучних капилара. Класичних лобулуса у јетри има више од милион, вишеугаоног су облика, а на њиховој периферији се налазе портни простори, а у центру централна вена. Портни простори су смештени на угловима и садрже везивно ткиво, лимфне судове и нервна влакна, као и порталну тријаду коју чине грана хепатичке артерије, грана портне вене и почетни жучни канал. Хепатоцитне плоче пружају се у виду зрака ка периферији лобулуса, а између њих се налазе синусоиди. Крв се у јетру допрема из два извора, портна вена доводи крв богату хранљивим материјама из

слезине и панкреаса (функционални крвоток), док хепатичка артерија доводи оксигенисану крв (нутритивни крвоток).[211,212]



Слика 2.17. Илустративни приказ грађе а) јетре, б) класичног јетриног лобулуса и в) хепатоцита. Преузето из Gartner и Hiatt (2014)[211]

У синусоидним капиларима се артеријска и венска крв мешају и теку ка средини лобулуса тј. централној вени, док се жуч креће у супротном правцу. У изградњи зида синусоида учествују ендотелне ћелије и Купферове ћелије (макрофаги), а између синусоидних капилара и хепатоцита налазе се перисинусоидни (Дизеови) простори у којима су присутне перисинусоидне (Ито) ћелије. Купферове ћелије су звездастог облика, веома су активне у фагоцитози, а главна улога им је разградња остарелих еритроцита и хемоглобина, лучење протеина у имуним процесима, као и разградња бактерија из крви. Ито ћелије су богате липидним капљицама испуњеним витамином А, па им је главна улога метаболизам и депоновање овог витамина, а такође учествују у синтези различитих протеина. Хепатоцити садрже једно или два једра, гранулисани ендоплазматски ретикулум у коме се синтетишу протеини и који формира базофилна телашца, агранулисани (глатки) ендоплазматски ретикулум где се врше реакције метиловања, оксидације и конјугације, пероксизоме који имају оксидативну функцију у гликонеогенези, метаболизму пурина, липида и алкохола, Голџијеве комплексе који учествују у секрецији жучи и синтези лизозома и просечно око 2000 митохондрија. Хепатоцоти се споро обнављају, али у случају губитка ткива јетре, услед дејства токсичних супстанци или хируршког одстрањивања, долази до изузетно ефикасне регенерације јетре која се остварује деобом хепатоцита са циљем потпуне надокнаде недостатка ткива.[211,213]

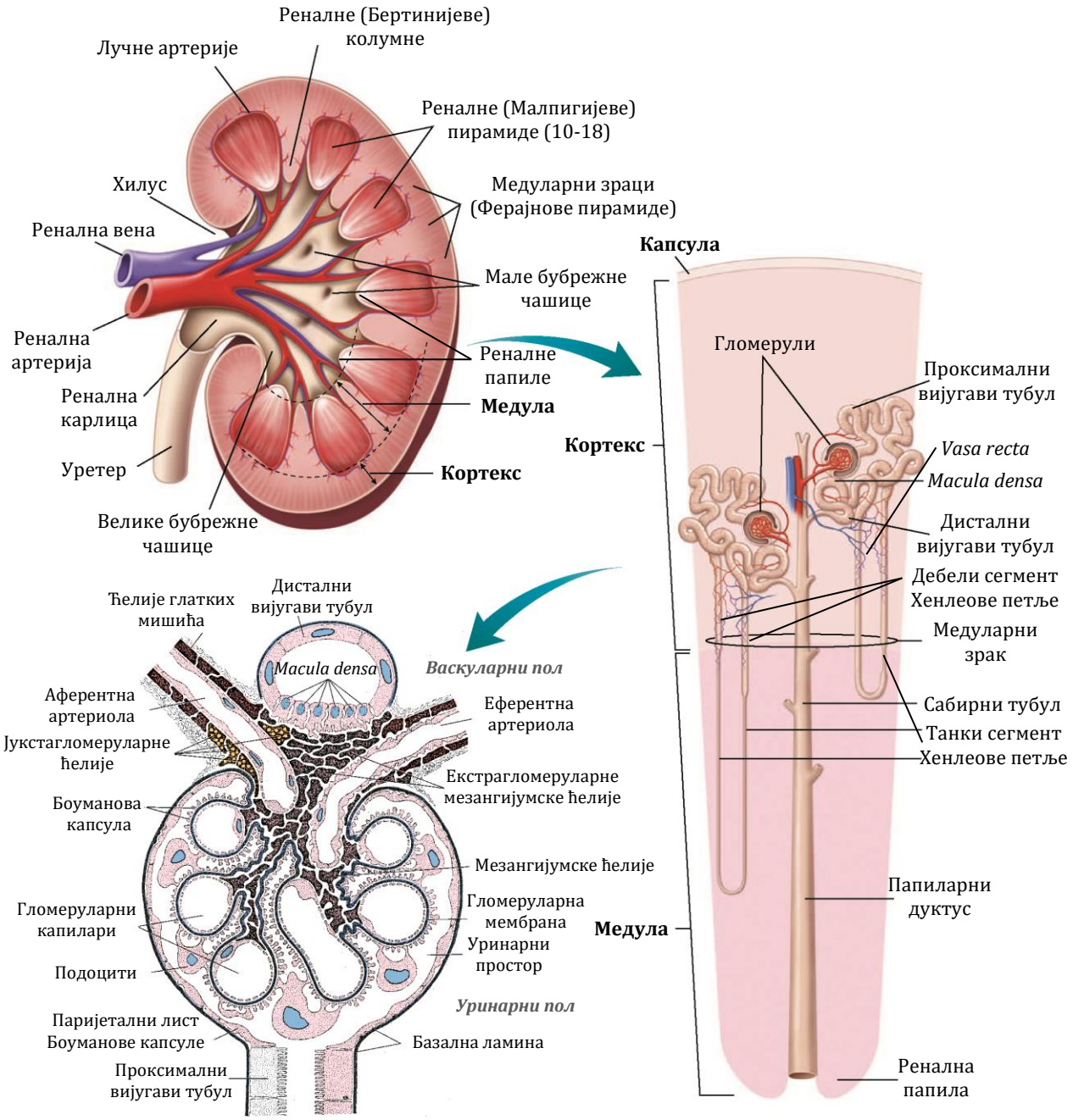
Јетра је карактеристична по својој јединственој двострукој физиолошкој функцији у људском организму, тачније она има ендокрину улогу јер синтетише и излучује албумине, протромбин, фибриноген и липопротеине у крв, али и егзокрину улогу јер различите компоненте доспеле крвљу трансформише и излучује преко жучних путева у облику жучи. Жуч се састоји од воде, електролита, жучних соли, жучног пигмента билирубина, фосфолипида и холестерола. Такође, у јетри се депонују метаболити, као што су липиди и угљени хидрати (у облику триглицерида и гликогена), који су неопходни за снабдевање организма енергијом, депонују се витамини (већ је поменут витамин А, али и витамини Д и $Б_{12}$), али је јетра способна и за синтезу масти и аминокиселина у процесу глуконеогенезе. У хепатоцитима јетре се врши и трансаминација и деаминација аминокиселина, настаје уреа која се излучује преко бубрега, а у митохондријама се одвија Кребсов циклус. Свакако најважнија улога за човека јесте управо детоксикација и неутрализација различитих ксенобиотика.[212,214,215]

Уринарни систем чине парни органи, бубрези и уретери (мокраћоводи), и непарни органи, мокраћна бешика и уретра (мокраћна цев), и сви учествују у одржавању хомеостазе организма регулисањем запремине и састава телесних течности помоћу процеса филтрације, апсорпције и секреције. Овим процесима се путем урина из организма елиминише вишак течности и електролита, као и продукти метаболизма који се излучују у виду уреје, мокраћне киселине и креатинина. Бубрези стварају око 1.5 L урина дневно, регулишу равнотежу течности и електролита, стварају хормон ренин који регулише крвни притисак, али и утичу на синтезу еритропоетина, гликопротеина који стимулише производњу еритроцита и хидролизује витамин $Д_3$.[212]

Бубрези (*лат*. „*ren*“, *Слика 2.18.*), као централни органи уринарног система, смештени су иза перитонеума у бубрежној ложи и обмотани фиброзном капсулом око које се налази бубрежно јастуче сачињено од масних наслага. Бубрег је пасуљастог облика, са испупченом спољашњом страном, док је унутрашња страна угнута са хилусом (улазним отвором) у средини. Кроз хилус у бубрег улазе ренална артерија и нерви, а излазе ренална вена, лимфни судови и уретер. Паренхим бубрега подељен је на две целине, кортекс или периферну зону и медула или унутрашњу зону. Медула се састоји од 10-18 реналних (Малпигијевих) пирамида троугластог облика, при чему је врх пирамиде усмерен ка хилусу, а база ка споља. Од база ка кортексу крећу Ферајнове пирамиде (медуларни зраци) и они са кортикалним паренхимом и бубрежном супстанцом између реналних пирамида, тзв. реналним (Бертинијевим) колумнама, чине целокупни кортекс. С друге стране, врхови реналних пирамида тј. реналне папиле проминирају у шупљине назване мале бубрежне чашице, више оваквих шупљина чине велике бубрежне чашице, а више чашица формирају почетни сегмент уретера, односно бубрежну карлицу.[213]

Основну структурну и функционалну јединицу бубрега чини нефрон и сваки бубрег садржи 1-3 милиона нефрона. Сваки нефрон је способан да самостално ствара урин. Грађа нефрона састоји се од бубрежног корпускула (телашца) и бубрежног тубула који је изграђен из проксималног вијугавог тубула, Хенлеове петље и дисталног вијугавог тубула. Већи број нефрона се улива у сабирни тубул, али ови тубули се не сматрају деловима нефрона. По положају у бубрегу нефрони се деле на кортикалне, са корпускулима у кортексу и Хенлеовим петљама које једва продиру у медулу, и јукстамедуларне нефроне чији су корпускули у близини медуле, а Хенлеове петље су дубоко у медули. Бубрежни корпускул представља почетни, проширени, лоптасти део нефрона где долази до филтрације крвне плазме. Састоји се од бубрежног гломерула окруженог Боумановом капсулом. Бубрежни гломерул састоји се од густо збијених капилара који повезују аферентну и еферентну артериолу, што представља уникатан случај капиларне мреже која се налази између два артеријска крвна суда – артеријски портални систем. Овај пол корпускула се назива васкуларним полом. Унутрашњи, висцерални лист Боуманове капсуле обавија капиларе гломерула, док спољашњи, паријетални лист означава границу бубрежног корпускула. Између њих се налази уринарни простор где се кроз зид капилара и висцерални лист филтрира крв, накупља се примарни урин и тај део корпускула представља уринарни пол. Ћелије висцералног листа назване подоцити су врло специфичне грађе. Простор између гломеруларних капиларних петљи испуњен је посебном ткивном супстанцом званом мезангијум. Он се састоји од интра- и екстрамезангијумских ћелија. Проток крви у оба бубрега код одраслих особа износи 1.2 до 1.3 L у минуту, тако да комплетна циркулаторна крв прође кроз бубреге за 4-5 минута. Гломеруларни филтрат настаје услед разлике између хидростатског притиска крви и онкотског притиска плазме (осмотски притисак крвне плазме), при чему је хемијски састав овог филтрата сличан саставу плазме, само не садржи протеине. Бубрежни тубул обавијен је једнослојним епителом, чије се ћелије у одређеним деловима разликују. Основна улога тубула је апсорпција воде, електролита и других нутритијената гломерулског филтрата, као и секреција неких неорганских јона. Регулација системског

крвног притиска могућа је посредством ренин-ангиотензин-алдостерон механизма, због постојања специјално диференцираних ћелија на васкуларном полу бубрежног корпускула које чине јукстагломерулски апарат. Овај апарат састоји се од јукстагломерулских ћелија (у којима је депонован ренин), екстрагломерулских мезангијумских ћелија и густе мрље (*macula densa*) која настаје налегањем дисталног вијугавог тубула на зид аферентне артериоле.[212,213]



Слика 2.18. Илустративни приказ грађе а) бубрега, б) нефрона и в) бубрежног телашцета. Модификовано из Ross (2011)[213]

Најзначајнија улога бубрега је свакако стварање урина, механизмом који обухвата следећа три процеса[214]:

1. *филтрација* – цеђење крвне течности кроз филтрациону баријеру у бубрежном корпускулу где настаје примарни филтрат крви;
2. *реапсорпција* – враћање супстанци из филтрата назад у крвоток, одвија се у тубулима, али се уреа, креатинин и соли типа нитрата, сулфата и фосфата, слабије реапсорбују у поређењу са водом;
3. *секреција* – транспорт јона и других супстанци у супротном смеру тј. концентрисање урина од Хенлеове петље па до сабирних тубула.

Функционални тестови који се користе за одређивање нормалног рада јетре и бубрега засновани су на одређивању активности ензима из ћелија јетре и концентрације нормалних физиолошких продуката јетре и бубрега у крвном серуму, плазми и урину. Стога се одређују функционални параметри јетре, пре свих утврђивање ензимске активности трансаминаза (аланин трансаминазе – ALT и аспартат трансаминазе – AST), алкалне фосфатазе – ALP, гама глутамил трансферазе – γGT, нивоа билирубина (директног, индиректног и укупног), триглицерида, холестерола и албумина. Што се тиче нормалне функције бубрега, она се утврђује одређивањем серумског нивоа креатинина, урее и мокраћне киселине.[216]

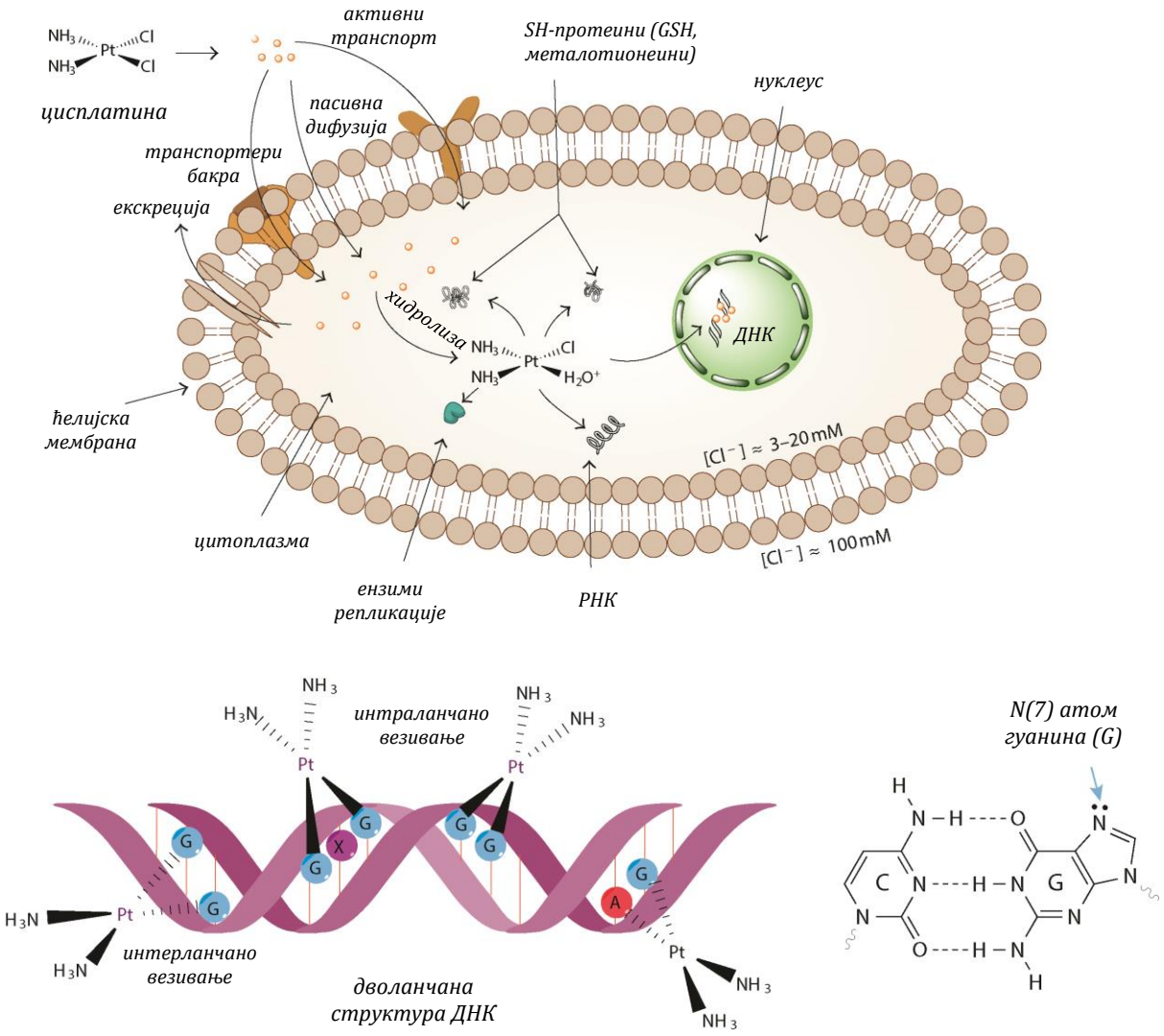
Као што је већ познато, поред васкуларне и метаболичке функције, јетра игра пресудну улогу у детоксикацији и екскрецији многих ендогених и егзогених супстанци (токсична једињења и лекови). Уколико дође до било каквог поремећаја у функцији јетре то се итекако може одразити на целокупно здравствено стање човека. Оштећења јетре повезана су са некрозом ћелија, повећањем нивоа липидне пероксидације и смањењем концентрације редукованог глутатиона (GSH), као и значајним повећањем биохемијских показатеља функције јетре у серуму. Поједини медикаменти, уколико се унесу у дози вишој од прописане, могу довести до оштећења јетре. Управо је хепатотоксичност узрок повлачења многих лекова са тржишта, јер је за више од 900 лекова потврђено да учествују у оштећењу ткива и функција јетре. Чак 50% од од свих акутних оштећења јетре повезани су са лековима изазваном хепатотоксичношћу. Хепатотоксичност је најчешће индукована превеликим дозама лекова који имају широку терапеутску употребу: аспартам, галактозамин, доксорубицин, ацетаминофен и цисплатина.[217–219] Лекове, који крвљу директно стижу из слезине и гастроинтестиналног тракта, јетра углавном идентификује као ксенобиотике па они подлежу различитим метаболичким процесима како би били доведени у облик погодан за елиминацију. Тако да глатки ендоплазматски ретикулум бива претворен у „фабрику метаболичког пречишћавања“. Метаболизам ксенобиотика се одвија у две фазе које обухватају бројне хемијске реакције којима могу настати и хемијски знатно активнији метаболити са потенцијално токсичним особинама. Многи од њих оштећују виталне ћелијске органеле, као што су митохондрије, и ослобађају реактивне супстанце које оштећују хепатичке ћелије. Такође, може доћи до активације ензима у систему цитохром P-450, а тиме и изазивања оксидативног стреса који узрокује промене у

јетри, док оштећење хепатоцита и жучних канала може довести до интрахепатичке акумулације жучи, што индукује цитотоксичност и даље хепатичко оштећење. Озледа ткива јетре се лако може утврдити одређивањем функционалних биохемијских параметара. На оштећење указују повећана активност ензима јетре (ALT и AST) настала услед ослобађања ових ензима из ћелија јетре у крвоток услед некрозе или оштећења и губљења функционалног интегритета ћелијске мембране. Такође, повећан ниво серумске ALP, укупних протеина и билирубина указује на смањену функцију хепатичких ћелија.[217,220] Сви ови процеси могу изазвати патолошке промене у ткиву јетре које се могу јасно уочити под светлосним микроскопом након бојења ткивног препарата. На препаратима најчешће су присутне следеће промене: конгестија, конфлуентна и фокална некроза, балонска или вакуоларна дегенерација, фиброза, инфилтрација инфламаторних ћелија, хиперплазија Купферових ћелија и дилатација синусоида.[221]

Акутно оштећење бубрега је стање које се често повезује са морбидитетом и морталитетом пацијената, што и није изненађујући податак, узимајући у обзир подложност реналног ткива оштећењима изазваним токсинима. Идентификовани су бројни патофизиолошки процеси који учествују у механизму нефротоксичности, од малих промена у гломеруларној и тубуларној функцији, па све до потпуне бубрежне инсуфицијенције.[216] Оксидативни стрес се и у овом случају налази у основи функционалних и структурних поремећаја бубрега, али се у великом броју случајева поред оксидативног стреса развија и нитрозативни стрес (карактерише се присуством реактивних врста азота). Многа системска обољења, као што су хипертензија, дијабетес, хиперхолестеролемија, затим инфекције, превелика конзумација алкохола и дувана, изложеност зрачењу могу узазвати оксидативни стрес у бубрезима и довести до стенозе реналне артерије, инфламације, фиброзних промена, апоптозе, мутација ДНК, склерозе гломерула и некрозе, што у крајњем случају води престанку рада ових органа и исхемијске нефропатије.[222] Разни ксенобиотици, у које се убрајају и лекови, могу довести до оксидативног стреса у бубрезима. Нефротоксичност показују неки често коришћени антибиотици, посебно аминогликозиди као што је гентамицин, антинеопластични медикаменти који се користе у третману метастазираних канцера (цисплатина, карбоплатина, метотрексат, доксорубицин, циклоспорин и адриамицин), али и контрастна средства која су трећи најчешћи узрок акутног оштећења бубрега.[222,223] Најчешће „мете“ токсичних агенаса су проксимални вијугави тубули који садрже транспортере који учествују у секрецији и реапсорпцији ксенобиотика. Промене у активности ових транспортера могу повећати акумулирање токсина и учинити бубреге осетљивим на оштећења.[224] Први знаци оштећења бубрега су повећан ниво урее (укупног азота) и креатинина у крвном серуму, као и појава уремије односно смањења производње урина. Доцније могу настати и промене у реналном ткиву типа конгестије, хидропсне дегенерације, десквамације и некрозе тубуларног епитела, едема, некрозе и крварења у интерстицијуму, као и атрофије гломерула.[223]

Један од најчешћих узрока развијања хумане нефро- и хепатотоксичности у току хемиотерапије јесте употреба антитуморског лека цисплатине. Цисплатина – *cis*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ (*cis*-диамминдихлоридоплатина(II)) је неорганско комплексно једињење

квадратно планарне геометрије, где је платина (II) окружена атомима хлора и амонијачним групама у *cis*-положају. Овај неорганski комплекс је у клиничкој употреби у третманима различитих типова канцера још од 1978. године када је одобрен од стране Америчке агенције за храну и лекове[225] и данас се налази на СЗО-листи основних лекова.[226]



Слика 2.19. Механизам деловања цисплатине и начини везивања за ДНК.
Представљено користећи публикације Kelland (2007)[231] *и Gómez-Ruiz et al. (2012)*[228]

Основа механизма антитуморског деловања цисплатине (*Слика 2.19.*) јесте интеракција са дезоксирибонуклеинским киселинама у ћелијама. Сматра се да цисплатина може дифундовати у ћелију углавном пасивном дифузијом, мада је могућ и активни транспорт помоћу плазма-мембранског Ctr1p транспортера. Након дисоцијације два хлоридна јона и формирања реактивног комплекса, цисплатина интерагује са ДНК стварајући интраланчано и интерланчано умрежавање уз локалну денатурацију ДНК

ланаца чиме спречава даљу репликацију и транскрипцију ДНК и тако испољава свој антиканцерогени ефекат.[227,228] Овај процес се пре свега одвија посредством везивања комплекса платине између N(7) и O(6) атома суседних молекула гуанина – G, а у мањем обиму преко N(7) и N(1) атома аденина – A или преко N(3) атома цитозина – C. Главни производ одговоран за антиканцерогену активност цисплатине јесте 1,2-гуаниндеоксинуклеотид (GpG) (чак око 65%), где је платина интраланчано координована за N(7) атоме у молекулима гуанина из суседних ДНК ланаца.[229–231]

Цисплатина се, као врло ефикасан хемиотерапеутски агенс, користи у терапијама различитих малигнитета, пре свега код канцера тестиса, јајника, главе и врата, мокраћне бешике, код цервикалног, езофагијалног и карцинома плућа.[228,232] Иако је ова улога цисплатине од изузетног значаја за лечење канцерогених обољења, ово једињење изазива бројне нежељене ефекте у организму, тако да су у терапији цисплатином честа повраћања, поремећаји дигестивног тракта, као и токсични ефекти на различите органе и системе органа.[225] Цисплатина најчешће изазива нефро- (20-41%), неуро- (30-86%) и ототоксичност (23-50%), и у неким случајевима мијелосупресију (<5%) и хепатотоксичност.[227,231,233,234] Оштећења бубрега најчешће настају јер се цисплатина углавном излучује из организма овим путем (чак 27-45% од укупне унете количине). Нефротоксичност индукована цисплатином може довести до акутног оштећења бубрега.[227,235] Штавише, цисплатина може у нешто мањем броју случајева изазвати и хепатотоксичност јер је јетра, као што је већ речено, главни орган за трансформацију и екскрецију ксенобиотика и лекова.[236] Како су циљ деловања цисплатине ДНК молекули, њена употреба у хемиотерапији може довести и до развоја секундарних малигнитета. Након третмана цисплатином могу настати оштећења митохондријалне ДНК која воде до мутагенеза, карциногенеза и апоптичке смрти ћелија.[237,238] Наведени токсични ефекти цисплатине настају због афинитета овог комплекса ка једињењима која садрже сумпор (као што су глутатион (GSH) – γ-L-глутамил-L-цистеинилглицин и металотионеини), при чему се тиолне групе координују за Pt(II) јон и тиме спречавају интеракцију цисплатине са ДНК. Тако формирани комплекси су изузетно реактивни и одговорни су за поменуте негативне особине.[229,230] Поред везивања цисплатине за различите молекуле у цитоплазми, још неки од предложених механизама цисплатином индуковане токсичности су повећано генерисање реактивних кисеоникових врста (ROS) и инхибиција антиоксидативних ензима (супероксид дисмутазе, глутатион пероксидазе и глутатион S-трансферазе). Евидентно је да формирање слободних радикала, оксидативни и нитрозативни стрес, као и њиховим деловањем изазвани инфламаторни процеси и прекид функционисања митохондрија имају веома важну улогу у појави токсичних ефеката цисплатине.[227,234,239–241]

Како је већ познато да је оксидативни стрес један од кључних узрочника настајања малигнитета, развија се још већи интерес ка проналажењу супстанци које би га спречиле, а у овом случају смањиле токсичност изазвану цисплатином. Изузетно велики број антиоксиданата и антиканцерогених супстанци изолован је из биљака у претходном периоду. Многи производи биљног порекла имају превентивну улогу тако што спречавају тумор-специфичне метаболичке путеве, могу да повећају ефикасност

хемиотерапеутика, смање споредне ефекте хемиотерапије или да делују на детоксикацију организма од хемиотерапеутика. Из тог разлога се пацијентима саветује да имају одговарајућу исхрану током хемиотерапије како би осигурали што боље здравствено стање.[242,243] Конзумација хране богате фенолним једињењима, иначе познатим антиксидантима, повезана је са позитивним физиолошким ефектима у карциногенези, од којих су свакако најзначајнији туморска превенција и ублажавање штетних ефеката хемиотерапеутика.[244] У фокусу научних истраживања је смањење нежељених ефеката цисплатине на нормално функционисање органа (посебно бубрега и јетре), које се поред неких синтетисаних лекова, може осигурати и употребом лековитих биљака и њихових фенолних конституената. Протективне особине лековитих биљака у стањима екстензивне нефро- и хепатотоксичности могу се пратити преко нивоа биохемијских функционалних параметара ових органа у серуму, одређивањем параметара оксидативног стреса у ткивима, патохистолошким посматрањем ткивних исечака, као и многим другим методама одређивања експресије различитих гена, нивоа инфламације, генотоксичних и антигенотоксичних ефеката итд.[245] Литературни подаци указују да су многи фитопрепарати показали изузетну способност превенције оштећења бубрега и јетре у третману цисплатином. Тако је протективна улога у односу на нефротоксичност цисплатине потврђена код екстраката ђумбира (*Zingiber officinale*)[246], алоје (*Aloe barbadensis*)[247] и семенки грожђа (*Vitis vinifera*)[248]. Такође, фенолна једињења, као што су рузмаринска киселина[249], рутин[250] и куркумин[251] смањују или ублажавају цисплатином индуковану нефро- и хепатотоксичност. Међутим, још увек је реч само о предклиничким испитивањима, а главну препреку клиничком испитивању и даљем фармацеутском развијању фитопрепарата представља недостатак темељнијих података о њиховој биолошкој доступности у људском организму.[245]

Иако је све већи број позитивних резултата које испољавају биљни препарати и компоненте изоловане из лековитих биљака, потребно је бити посебно опрезан при одабиру биљака и супстанци које се користе у третманима и свакако њиховом дозирању, јер многе од њих могу имати потпуно супротан ефекат. Поједина фитојединења имају изражене токсичне особине, појединачно или у комбинацији са другим једињењима. Забележени су и случајеви нестручне манипулације биљним дрогама, при чему је изазвана нефро-, хепато-, неуро- и имунотоксичност у великим размерама, чак и са смртним исходом.[252–254]

Циљеви рада

3

Предмет изучавања ове докторске дисертације је фитохемијски састав и фармаколошка активност метанолских екстраката надземних делова и корена биљака *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (медуника) и *Filipendula hexapetala* Gilib. (суручица), са фокусом на квалитативну карактеризацију и садржај фенолних једињења као најзначајнијих секундарних метаболита ових биљака, као и испитивање фармаколошког деловања екстраката, како у *in vitro*, тако и у *in vivo* условима. Постављање циља ове докторске дисертације заснива се на употреби наведених биљака из рода *Filipendula* у традиционалној медицини, не само српског, већ и других европских народа, за лечење запаљенских стања, обољења бубрега и ублажавање болова различитог порекла.

Нека од најважнијих питања на које ова докторска дисертација треба да пружи јасан одговор јесу: *Да ли и у којој мери одабране биљне врсте испољавају своје фармаколошко деловање*? Као и: *Да ли се биолошка активност може повезати са њиховим хемијским саставом?* Доказати оправданост постојеће примене, као и изналажење нових видова употребе ових лековитих биљака у сврху лечења многих других обољења, а на основу показаних резултата фармаколошке активности, главни је циљ овог рада.

Дакле, задатак који је постављен у експерименталном сегменту ове дисертације био је испитати ниво потенцијалног фармаколошког деловања метанолских екстраката надземних делова и корена биљака рода *Filipendula* које расту на територији Србије, и то пре свега у *in vitro* условима где се одређује антиоксидативна активност, антимикробни и антиканцерогени потенцијал, као и антиинфламаторно деловање екстраката. Потом је било потребно потврдити фармаколошки потенцијал у *in vivo* испитивањима на експерименталним животињама: протективна активност екстраката при оксидативном стресу изазваном коришћењем антиканцерогеног лека цисплатине, заштита на нивоу бубрега и јетре где се, поред биохемијских параметара серума и ткивних параметара испитују хистопатолошке промене и генотоксични и антигенотоксични ефекти. Такође, циљ је био и у *in vivo* условима потврдити антиинфламаторну активност екстраката. Поред тога, у овој докторској дисертацији била је неопходна што детаљнија карактеризација хемијског састава екстраката како би били испуњени сви предуслови за безбедну употребу ових лековитих биљака у сврху побољшања здравственог стања људи, као и апликацију у фармацеутској, прехрамбеној и козметичкој индустрији.

Научно-истраживачки рад у оквиру ове докторске дисертације обухвата следећа испитивања:

- Екстракција биљног материјала и стандардизација екстраката биљака *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. и *Filipendula hexapetala* Gilib. методама танкослојне хроматографије (TLC и HPTLC).
- Одређивање присуства и квантификовање одабраних фенолних једињења у добијеним екстрактима течном хроматографијом високих перформанси са UV детекцијом (HPLC-DAD).

- Одређивање секундарних метаболита у екстрактима течном хроматографијом и масеном спектрометријом (LC-MS).
- Одређивање количине укупних фенолних једињења и појединих група фенолних једињења спектрофотометријским методама.
- Одређивање антиоксидативне активности екстраката *in vitro* методама и испитивање способности инхибиције липидне пероксидације у оквиру три различита модел система.
- Испитивање стабилности биљних екстраката у зависности од промене pH вредности и температуре, као и у току *in vitro* дигестије.
- Одређивање антибактеријске и антифунгалне активности екстраката.
- Одређивање цитотоксичности екстраката на нормалној ћелијској линији и ћелијским линијама канцера.
- *In vitro* испитивање антиинфламаторне активности екстраката на основу способности инхибиције активности циклооксигеназе-1 и циклооксигеназе-2, као и инхибиције експресије NF-κB/COX-2 гена.
- *In vivo* испитивање антиинфламаторне активности екстраката на експерименталним животињама, које обухвата одређивање антиедематозног потенцијала и способност редуковања болног стимулуса.
- *In vivo* испитивање нефропротективне и хепатопротективне активности екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala,* које подразумева испитивање дејства екстраката на експерименталне животиње које су истовремено третиране и агенсом који изазива токсичност и доводи до оштећења бубрега и јетре, праћење параметара нормалне функције у серуму и хомогенатима ткива експерименталних животиња који указују на оксидативни статус организма, хистопатолошка испитивања исечака бубрега и јетре, као и утврђивање степена генотоксичности у ћелијама испитиваних органа.

Експериментални део

4

4.1. Сакупљање биљног материјала и припрема сувих екстраката

Надземни део (*herba*) и корен са ризомом (*radix et rhizoma*) биљке *Filipendula hexapetala* Gilib. сакупљен је на локалитету Шумарице у Крагујевцу (Република Србија), у мају 2013. године. Након детерминације, биљка је систематисана и депонована у хербаријуму Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, са бројем ваучера 111/013.

Биљни материјал (надземни део и корен) *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. сакупљен је на планини Гоч (Република Србија), у јулу 2013. године. Биљка је систематисана и депонована у хербаријуму Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, и води се под систематским бројем 112/013.

Сушење биљног материјала *F. ulmaria* и *F. hexapetala* је обављено по пропису Европске Фармакопеје.[255] Биљни материјал сушен је на ваздуху у танком слоју, у добро проветреној просторији, на собној температури (око 25°C), заштићен од директне сунчеве светлости. Осушени делови испитиваних лековитих биљака су исечени на ситније комаде, а потом добро уситњени коришћењем блендера.

Припрема метанолних екстраката надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* обављена је мацерацијом, по следећој процедури: одмерено је 94 g уситњеног надземног дела и 113 g корена биљке *F. ulmaria,* као и 60 g надземног дела и 60 g корена биљке *F. hexapetala*. Након тога, одмерене количине уситњеног биљног материјала преливене су са 500 mL метанола (CH_3OH, анхидровани, 99.8%) у случају *F. ulmaria*, односно 300 mL метанола у случају *F. hexapetala* и материјал је мациран наредних 24 h, на собној температури, у мраку. Екстракти су потом процеђени кроз филтер папир Whatman No. 1, филтрат је сачуван, а поступак екстракције метанолом понављан је још два пута у наредних 48 h са биљним материјалом заосталим из првог циклуса екстракције. Након укупно 72 h добијено је 3 филтрата по узорку, који су потом спојени и пажљиво упаравани на ротационом вакуум упаривачу, на температури не већој од 40°C, до сува. У *Табели 4.1.* приказане су масе добијених сувих екстраката и одговарајући приноси истих.

Табела 4.1. Масе (g) и приноси (w/w) сувих екстраката надземних делова (хербе са цвасти) и корена биљака F. ulmaria и F. hexapetala

Екстракт биљке	Део биљке	Скраћеница	Маса екстракта (g)	Принос (% w/w)
F. ulmaria	надземни део	FUA	7.25 g	8.0%
F. ulmaria	Корен	FUR	31.38 g	27.8%
F. hexapetala	надземни део	FHA	11.9 g	20.52%
F. hexapetala	Корен	FHR	35 g	31.82%

4.2. Одређивање количине фенолних једињења у биљним екстрактима

4.2.1. Одређивање укупне количине фенолних једињења

Укупна количина фенолних једињења у метанолним екстрактима надземног дела и корена *F. ulmaria* и *F. hexapetala* одређивана је методом по Фолин-Чиколту (Folin-Ciocalteu).[256] Метода се заснива на мерењу укупног редукционог капацитета фенолних једињења у реакцији са Folin-Ciocalteu фенолним реагенсом (смеша Na_2MoO_4, Na_2WO_4, HCl, H_3PO_4 и $LiSO_4$; Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Немачка). При базним pH вредностима долази до трансфера електрона и редукције жутог комплекса фосфор-молибденске/фосфор-волфрамове киселине при чему настаје плаво обојени јон $(\text{Фенол-MoW}_{11}O_{40})^{4-}$ чији је интензитет апсорбанце пропорционалан количини фенолних једињења у узорку и може се пратити спектрофотометријски на 765 nm.

$$Na_2WO_4/Na_2MoO_4 + \text{фенол} \rightarrow (\text{фенол-MoW}_{11}O_{40})^{4-}$$
$$\text{Mo (VI) (жуто обојен)} + e^- \rightarrow \text{Mo (V) (плаво обојен)}$$

Реагенси:

1. Folin-Ciocalteu фенолни реагенс (разблажен дестилованом водом у односу 1:10);
2. Натријум-хидрогенкарбонат ($NaHCO_3$, 7.5%);
3. Стандардни раствор галне киселине (1 mg/mL, у метанолу);
4. Раствори екстраката (1 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

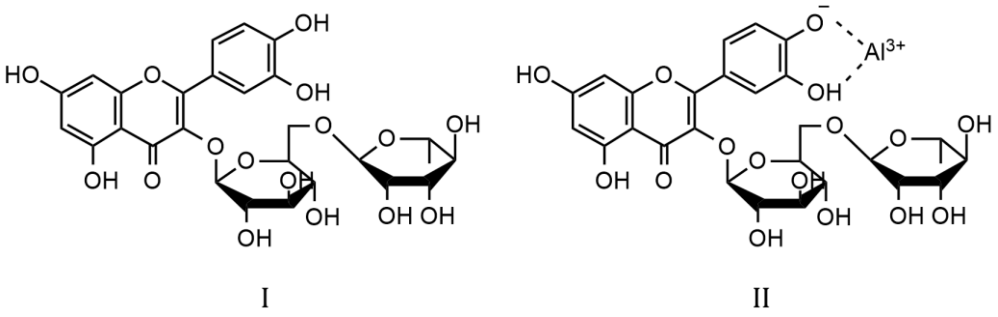
Разблажења раствора галне киселине за стандардну праву направљена су у распону концентрација од 0.1 до 0.2 mg/mL. У 0.5 mL узорка (гална киселина, екстракт) додато је 2.5 mL Folin-Ciocalteu фенолног реагенса и 2 mL $NaHCO_3$. Слепа проба је припремљена упоредо, са 0.5 mL метанола уместо узорка. Након 15 min инкубирања на 45°C апсорбанца је мерена спектрофотометријски на 765 nm.

Садржај укупних фенолних једињења у узорку израчунат је на основу једначине калибрационе праве (функција апсорбанције у зависности од концентрације) стандардног раствора галне киселине, $y = 5.2963x - 0.0094$ ($R^2 = 0.9961$). Резултат је изражен као средња вредност три независна мерења (± стандардна девијација, С.Д.), у еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GKE/g екстракта).

4.2.2. Одређивање укупне количине флавоноида

Укупна количина флавоноида у екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala* одређивана је методом са алуминијум (III)-хлоридом коју су описали Brighente *et al.* (2008).[257] Ова метода заснована је на особини фенолних једињења, а нарочито

флавоноида и флавоноидиних гликозида, да са металним јонима (магнезијум, алуминијум, гвожђе) граде различите комплексе. Присуство металног јона значајно утиче на хемијске особине самог комплекса, они могу померити апсорпциони спектар и променити R_f вредност једињења на танкослојној хроматографији.[133] На *Слици 4.1.* приказан је комплекс флавоноидног гликозида рутина, који је коришћен као стандард, са Al^{3+} јоном. Ова особина флавоноидних металних комплекса се користи за идентификацију и квантификацију флавоноида, а апсорбанца насталог комплекса може се мерити спектрофотометријски на 415 nm.



I II

Слика 4.1. Молекулска структура флавоноидног гликозида рутина (I) и његовог 1:1 комплекса са Al^{3+} јоном (II)

Реагенси:

1. Алуминијум (III)-хлорид ($AlCl_3$, 2%, у метанолу);
2. Стандардни раствор рутина (1 mg/mL, у метанолу);
3. Раствори екстраката (1 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Разблажења раствора рутина за стандардну криву направљена су у распону концентрација од 0.02 до 0.1 mg/mL. У 0.5 mL узорка (рутин, екстракт) додата је иста запремина $AlCl_3$. Слепа проба је припремљена без додавања $AlCl_3$. Након 1 h инкубације на собној температури апсорбанца је мерена спектрофотометријски на 415 nm.

Укупна количина флавоноида у узорку израчуната је на основу калибрационе праве стандардног раствора рутина ($y = 18.05x - 0.017$, $R^2 = 0.999$). Резултат је изражен као средња вредност три независна мерења (± С.Д.), у еквивалентима рутина по граму сувог екстракта (mg RUE/g екстракта).

4.2.3. Одређивање укупне количине флавонола

Садржај укупних флавонола у испитиваним екстрактима одређен је методом по Yermakov *et al*. (1987).[258] Као и у претходном случају, и ова метода се заснива на грађењу металних комплекса флавонола са јонима алуминијума, при чему се промена апсорбанце прати на λ_{max} 440 nm.

Реагенси:

1. Алуминијум (III)-хлорид ($AlCl_3$, 2%, у метанолу);
2. Натријум ацетат (CH_3COONa, 50 mg/mL);
3. Стандардни раствор рутина (1 mg/mL, у метанолу);
4. Раствори екстраката (1 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Разблажења раствора рутина за стандардну праву направљена су у распону концентрација од 0.02 до 0.08 mg/mL. У 1 mL узорка дода се 1 mL $AlCl_3$ и 3 mL CH_3COONa. По завршетку инкубације од 2.5 h апсорбанца узорка је очитана спектрофотометријски на 440 nm.

Укупна количина флавонола у узорку израчуната је на основу једначине стандардне праве раствора рутина ($y = 6.343x + 0.017$, $R^2 = 0.988$). Резултат је изражен као средња вредност три независна мерења (± С.Д.), у еквивалентима рутина по граму сувог екстракта (mg RUE/g екстракта).

4.2.4. Одређивање укупне количине фенолних киселина

Процедура за одређивање укупне количине фенолних киселина у биљним екстрактима преузета је из Пољске фармакопеје (2005).[259]

Реагенси:

1. Хлороводонична киселина (HCl, 0.1 M);
2. Arnow реагенс (10% натријум молибдат и 10% натријум нитрит);
3. Натријум хидроксид (NaOH, 1 M);
4. Стандардни раствор кафеинске киселине (1 mg/mL, у метанолу);
5. Раствори екстраката (1 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Разблажења раствора кафеинске киселине за стандардну праву направљена су у распону концентрација од 0.02 до 0.1 mg/mL. У 1 mL узорка (раствора кафеинске киселине и раствора екстраката) дода се 5 mL дестиловане воде, а затим се тој смеши додају следећим редоследом: 1 mL HCl, 1 mL Arnow-ог реагенса и 1 mL NaOH. Након тога, дестилованом водом се допуни до запремине од 10 mL и апсорбанца узорка се одмах мери спектрофотометријски на 490 nm.

Укупна количина фенолних киселина у узорку израчуната је на основу једначине стандардне праве раствора кафеинске киселине ($y = 6.2844x - 0.0038$, $R^2 = 0.9989$). Резултат је изражен као средња вредност три независна мерења (± С.Д.), у еквивалентима кафеинске киселине по граму сувог екстракта (mg KKE/g екстракта).

4.2.5. Одређивање укупне количине кондензованих танина

Укупна количина кондензованих танина у екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala* одређивана је по методи описаној од стране Scalbert *et al*. (1989).[260] Поступак се заснива на способности формалдехида да таложи кондензоване танине (проантоцијанидине).

Реагенси:

1. Флороглуцинол (1,3,5-бензентриол, $C_6H_6O_3$);
2. Хлороводонична киселина (2:5 HCl/H_2O);
3. Формалдехид (HCHO, 13 mL 37% формалдехида разблажено водом до 100 mL);
4. Раствори екстраката (1 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Први корак у одређивању кондензованих танина у екстрактима јесте одређивање количине укупних фенолних једињења (већ описаном Folin-Ciocalteu методом). На сваки еквивалент галне киселине у узорку дода се 0.5 mol-еквивалента флороглуцинола. У 2 mL ове смеше дода се 1 mL раствора HCl и 1 mL раствора формалдехида. Након 24 h инкубације на собној температури настали талог се процеди на вакууму и у супернатанту се одређује укупна количина несталожених фенолних једињења (Folin-Ciocalteu методом). Талог садржи кондензоване танине и познату количину флороглуцинола који се увек квантитативно таложи.

Из разлике у количини укупних фенолних једињења и неисталожених фенола израчунава се садржај укупних кондензованих танина изражен у еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GKE/g екстракта), као средња вредност три независна мерења (± С.Д.).

4.2.6. Одређивање укупне количине галотанина

Галотанини могу бити квантитативно одређивани методом са калијум јодатом. Ову методу први је описао Haslam (1965)[261] и базирана је на реакцији калијум јодата са галоил естрима, при чему настаје интермедијер црвене боје и на крају жуто једињење. Концентрација црвеног интермедијера може се спектрофотометријски мерити на 550 nm.

Реагенси:

1. Калијум јодат (KIO_3, засићени раствор);
2. Стандардни раствор галне киселине (1 mg/mL, у метанолу);
3. Раствори екстраката (1 mg/mL, у метанолу).

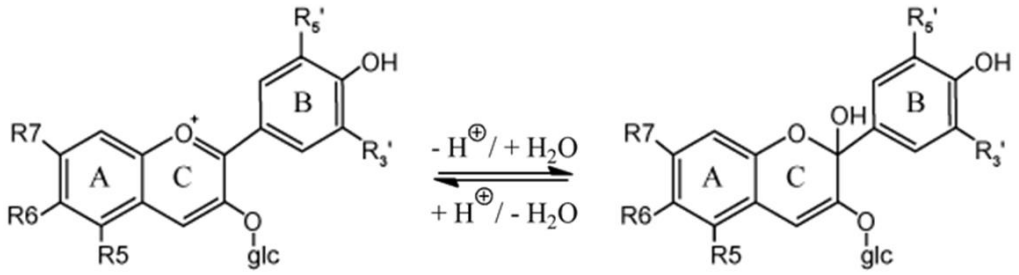
Поступак:

У 3.5 mL узорка дода се 1.5 mL KIO_3. Затим се смеша инкубира на температури око 40°C и прати промена апсорбанце приликом настајања црвеног интермедијера, све до постизања максималне вредности апсорбанце на 550 nm (независно од времена). Укупна количина галотанина у узорку изражена је у еквивалентима галне киселине (y = 4.3537x + 0.0072, R^2 = 0.9935) по граму сувог екстракта (mg GKE/g екстракта), као средња вредност три независна мерења (± С.Д.).

4.2.7. Одређивање количине мономерних и укупних антоцијана

„Сингл“ pH и pH диференцијална метода, описане од стране Giusti и Wrolstad (2001)[262], коришћене су за одређивање садржаја мономерних и укупних антоцијана у метанолним екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala*. Метода се заснива на особини антоцијана да, при промени pH средине, реверзибилно мењају своју структуру, при чему долази до промене апсорпционог спектра.

Садржај укупних антоцијана (мономерних и полимеризованих антоцијана) одређује се „сингл“ методом по којој је измерена апсорбанца раствора антоцијана на pH 1.0 пропорционална садржају укупних антоцијана. Одређивање садржаја мономерних антоцијана изводи се pH диференцијалном методом која се заснива на особини мономерних антоцијана да су при pH 1.0 у облику оксонијум јона (флавилијум катјона) црвене боје, док су при pH 4.5 у полукеталном облику (безбојан) (*Схема 4.1.*).



флавилијум катјон
(pH < 3, црвен)

хемикетал
(pH 4-5, безбојан)

Схема 4.1. Облици мономерних антоцијана у киселој pH средини као основа pH диференцијалне методе одређивања (на pH мањим од 3 црвене боје, на pH 4-5 безбојни)

Реагенси:

1. Калијум хлоридни пуфер (KCl/HCl, 0.025 M, pH 1.0);
2. Натријум ацетатни пуфер (CH_3COONa/CH_3COOH, 0.4 M, pH 4.5);
3. Раствори екстраката (2 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Први корак је одређивање одговарајућег фактора разблажења (F) тако што се одређена запремина узорка разблажи са KCl-пуфером pH 1.0 тако да на λ_{max} 520 nm апсорбанца буде мања од 1.2 (по могућству од 0.4 – 0.7). Након тога се припреме два утврђена разблажења истог узорка до укупне запремине од 10 mL, једно са KCl-пуфером pH 1.0, а друго са CH_3COONa-пуфером pH 4.5. После 15 min инкубирања на собној температури апсорбанца се мери на 520 nm и 700 nm (због корекције евентуалног замућења). Разлика у апсорбанци између ова два раствора настаје због мономерних антоцијанских пигмената.

Садржај мономерних и укупних антоцијана изражен је у еквивалентима цијанидин-3-гликозида по граму сувог екстракта (mg Cy 3-glc/g екстракта).

За израчунавање количине мономерних антоцијана коришћена је следећа једначина (1):

$$[\text{мономерни антоцијани}]\ (\text{mg/L}) = \frac{\text{A}\times\text{MM}\times\text{F}\times 1000}{\varepsilon\times \text{l}} \quad (1)$$

За израчунавање количине укупних антоцијана коришћена је једначина (2):

$$[\text{укупни антоцијани}]\ (\text{mg/L}) = \frac{\text{A}'\times\text{MM}\times\text{F}\times 1000}{\varepsilon\times \text{l}} \quad (2)$$

Где је: $A = (A_{\lambda max} - A_{700})_{\ pH=1.0} - (A_{\lambda max} - A_{700})_{\ pH=4.5}$, λ_{max} = 520 nm;

$A' = (A_{\lambda max} - A_{700})_{\ pH=1.0}$; MM = молекулска маса (449.2 g/mol цијанидин-3-гликозид); F = фактор разблажења; ε = коефицијент моларне екстинкције, L mol^{-1} cm^{-1} (26900 L mol^{-1} cm^{-1} цијанидин-3-гликозид); *l* = дужина пута (1 cm).

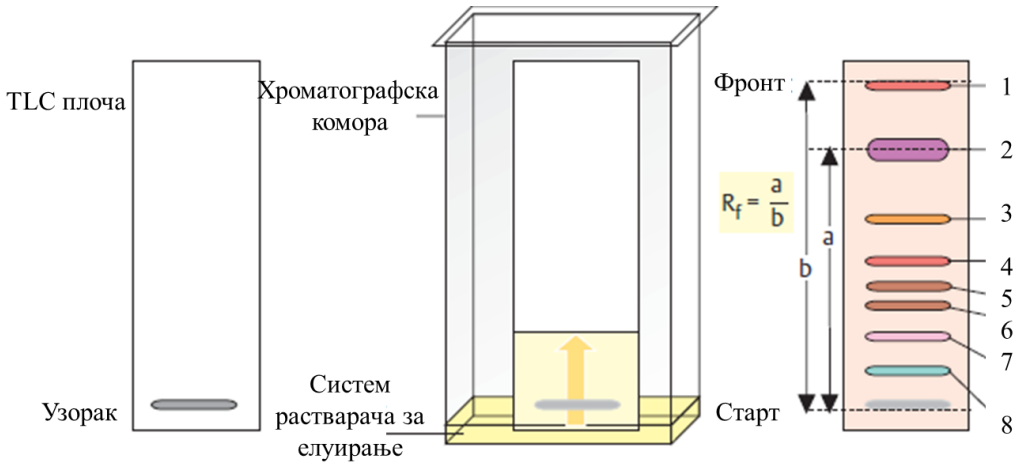
4.3. Стандардизација испитиваних екстраката

За разлику од савремених медицинских средстава, традиционални лекови биљног порекла често нису довољно проучавани, тако да, без основних података о њиховом саставу и деловању, они могу бити изузетно опасни. Према подацима Светске здравствене организације (СЗО) традиционални лекови биљног порекла користе се у развијеним земљама, као и у земљама у развоју где чине чак и до 80% примарне здравствене заштите.[263] Некада су ови препарати једино што становништво може приуштити. Из тих разлога, неопходна је прецизна евалуација и стандардизација ових производа, као и сувих биљних екстраката, како би се добиле информације о њиховом хемијском саставу и извршила њихова прецизна идентификација.

Стандардизација биљних екстраката се може извршити основним хроматографским техникама у поређењу са стандардним једињењем (маркер једињење) или више њих, за које се из литературних података зна да их биљна врста која је предмет испитивања садржи.

4.3.1. Стандардизација применом танкослојне хроматографије (TLC)

За основну стандардизацију екстраката надземног дела и корена биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* коришћена је метода танкослојне хроматографије (*енг.* „thin-layer chromatography“ – TLC). TLC хроматографија користи се за раздвајање неиспарљивих компоненти из смеша. Изводи се на плочама (стакленим, алуминијумским, пластичним) које су прекривене танким слојем адсорбента, најчешће силика-гелом, који представља стационарну фазу. Мобилну фазу чини смеша мање или више поларних растварача, у зависности од особина узорка који се жели анализирати.



Слика 4.2. Фазе TLC хроматографске анализе: (I) наношење узорка на плочу; (II) развијање хроматограма; (III) визуализација мрља и одређивање R_f вредности[264]

Да би се постигло добро раздвајање потребно је ускладити састав мобилне фазе са врстом и дужином подлоге. Компонента смеше која се најбоље раствара у мобилној фази прелази најдужи пут, јер ту компоненту мобилна фаза носи са собом најдаље од старта. Након развијања хроматограма мрље се могу визуализовати коришћењем различитих реагенаса за визуализацију (анисалдехид-H_2SO_4 реагенс, јодоплатинат реагенс, ванилин-H_3PO_4 реагенс, NPR/PEG реагенс итд.), а потом се врши одређивање вредности ретенционих фактора (R_f) на основу којих се идентификују компоненте смеше. R_f вредност се дефинише као однос дужине пређеног пута компоненте (*a*) и дужине пређеног пута растварача (*b*) (*Слика 4.2.*)

За стандардизацију испитиваних екстраката помоћу TLC хроматографије коришћена је метода из литературе која се примењује за стандардизацију екстракта цвета *F. ulmaria* (*Spireae flos*).[136] Суви екстракти су растворени у метанолу у концентрацији 5 mg/mL. Референтна једињења која су коришћена као маркери, хиперозид (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), спиреозид (Extrasynthese, Genay, France) и рутин (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), такође су растворена у метанолу у концентрацији 1 mg/mL. Аликвоти метанолних раствора екстаката (20 μL) и референтних једињења (10 μL)

аплицирани су на TLC плоче димензија 10 × 12 cm, прекривене силика гелом 60 F_{254} (Merck, Darmstadt, Немачка), апроксимативно 1.5 cm од ивице плоче.

За елуирање је коришћен систем растварача: етил ацетат – мравља киселина – глацијална сирћетна киселина – вода (100:11:11:26). Развијање хроматограма обављено је у затвореној стакленој комори, у којој је у претходних 1 h атмосфера засићена парама елуента. Након дериватизације хроматограма са NPR/PEG реагенсом за детекцију флавоноида (природни производи-полиетилен гликол реагенс, *енг.* „Natural products-polyethylene glycol reagent“, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Немачка) који садржи 2-диаминоетилдифенил борат ($C_{14}H_{16}BNO$) и полиетилен гликол, а потом сушења феном у трајању до 10 min, вршена је детекција у UV комори помоћу UV–лампе на таласној дужини 365 nm. Поређењем R_f вредности чистих фенолних једињења са R_f вредностима компоненти у екстрактима, као и визуалном детекцијом промене боје након дериватизације, утврђује је присуство референтних једињења у екстрактима биљака.

4.3.2. Стандардизација применом танкослојне хроматографије високих перформанси (HPTLC)

За стандардизацију метанолних екстраката надземних делова и корена *F. ulmaria* и *F. hexapetala* коришћен је TLC систем високих перформанси – HPTLC систем (CAMAG, Muttenz, Швајцарска) опремљен са winCATS софтвером (CAMAG). Уређај се састоји од аутоматског TLC „семплера“ (Automatic TLC Sampler 4 – ATS 4) са доводом за гас (азот), аутоматске коморе за развијање хроматограма (Automatic Developing Chamber – ADC 2), коморе за визуализацију и документацију TLC хроматограма (Reprostar 3 UV TLC viewer) и рачунара са winCATS софтвером на коме се дефинишу услови и прати цео поступак хроматографије, од наношења узорка на плоче па све до визуализације добијених TLC хроматограма узорака.

HPTLC профили узорака су развијани како би се са већом прецизношћу доказало присуство нешто већег броја референтних полифенолних једињења, и то флавоноида и флавоноидних гликозида. Као референтне компоненте коришћене су хиперозид, рутин, апигенин, спиреозид, кверцетин, изокверцитрин (Carl Roth, Karlsruhe, Немачка) и спиреозид (Extrasynthese, Genay, Француска). Сва референтна једињења растворена су у метанолу у концентрацији 0.5 mg/mL. Припремљени су и раствори испитиваних екстраката (FUA, FUR, FHA и FHR) у метанолу у концентрацији 5 mg/mL. За хроматографију се користе специјалне HPTLC стаклене плоче 60 F_{254} са силика-гелом, димензија 20 × 10 cm, дебљине 0.25 mm, величине честица 5–6 μm (Merck, Darmstadt, Немачка). У софтверу су подешени параметри за апликацију узорака на плочу: дужина апликационе траке 10 mm, запремина екстраката за апликацију 10 μL, запремина стандарда за апликацију 5 μL, као и позиција трака на плочи. Систем растварача коришћен за елуирање је био исти као и у претходној TLC хроматографији: етил ацетат – мравља киселина – глацијална сирћетна киселина – вода (100:11:11:26).[136]

Систем растварача је пребачен у аутоматску комору (ADC 2) обложену одговарајућим филтер папиром и претходно засићену мобилном фазом (25 mL) у трајању од 30 min. Време потребно за аклиматизацију плоче је подешено на 5 min, миграциона удаљеност растварача 85 mm, и време сушења на 5 min. Након сушења, плоча је визуализована и документована у програму winCATS помоћу коморе за визуализацију и документацију TLC хроматограма на различитим режимима осветљења (видљива - бела светлост, UV 254 nm и UV 366 nm). Детекција мрља је изведена прскањем плоче са NPR/PEG реагенсом, сушењем 10 min и визуализовањем под видљивом светлости и на UV-светлости таласне дужине 366 nm.

4.4. Анализа хемијског састава испитиваних екстраката

4.4.1. HPLC анализа и квантификација одабраних фенолних једињења

Течна хроматографија високих перформанси (*енг.* „high-performance liquid chromatography“ – HPLC, раније „high pressure liquid chromatography“) је аналитичка метода која је у широкој употреби за изолацију, идентификацију и квантификацију компоненти у мешавини. HPLC анализа је изузетно погодна за утврђивање хемијског састава биљних екстраката и њихових фракција.

Идентификација фенолних једињења у метанолним екстрактима надземног дела и корена биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* вршена је на HPLC систему (Shimadzu Prominence, Kyoto, Јапан) који се састоји од контролера система (CBM-20A), грејача колоне (CPO-20AC) и пумпе за довођење растварача са дегасером (DGU-20A5) који је опремљен PDA детектором (*енг.* „Photo Diode Array detector“ - SPD-M20A) који прати опсег таласних дужина од 190 - 800 nm. За обраду резултата коришћен је софвер LC Solution 1.24 SP1. Хроматографија је извођена коришћењем Phenomenex Kinetex® C18 колоне (димензија 10 cm × 4.6 mm, величина честица 2.7 μm) на 40°C и проток мобилне фазе је подешен на 2 mL/min. Као мобилна фаза A коришћена је вода, а као мобилна фаза B коришћен је ацетонитрил. Обе мобилне фазе садржале су 0.1% трифлуоросирћетну киселину и раздвајање компонената вршено је градијентом према следећој шеми: 0-1 min 5% B, 1-10 min 5-30% B, 10-15 min 100% B. Инјекциона запремина за све узорке била је 5 μL.

Детекција фенолних једињења вршена је на 260, 280, 325 и 330 nm. Идентификација фенолних киселина и флавоноида вршена је поређењем ретенционих времена и апсорпционих спектара непознатих пикова са референтним стандардима, као и кохроматографијом са стандардима који су додати узорку ради потврђивања присуства идентификованих једињења. Узорци екстраката за HPLC анализу припремљени су у концентрацији 1 mg/mL, у метанолу и пре анализе су профилтрирани кроз 0.2 μm шприц-филтер за HPLC анализу. За квантификацију фенолних једињења у екстрактима направљене су калибрационе криве следећих референтних стандарда: гална киселина

(≥98% чистоће,), кафеинска киселина (≥98% чистоће), ванилинска киселина, елагинска киселина, (+)-катехин, епикатехин, кверцетин, хиперозид, рутин, спиреозид и кемпферол. Гална киселина, ванилинска киселина, кемпферол и кверцетин набављени су од Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Немачка), кафеинска киселина од Merck KGaA (Darmstadt, Немачка), (+)-катехин и елагинска киселина од Serva (Heidelberg, Немачка), хиперозид и рутин од Carl Roth (Karlsruhe, Немачка), (-)-епикатехин од Thermo Fisher Scientific (Geel, Белгија) и спиреозид је набављен од Extrasynthese (Genay, Француска). Стандардни раствори припремљени су у метанолу у осам различитих масених концентрација: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 и 0.78125 μg/mL. Линеарна регресиона анализа калибрационих кривих стандардних једињења потврдила је одличну линеарност са коефицијентим корелације $R^2 = 0.999$, $p < 0.001$ у свим случајевима.

Идентификација пикова је извршена софтвером HP Chemstation chromatographic (Palo Alto, CA, САД), који је такође коришћен за обраду података и method/run контролу. Укупна количина фенолних једињења у свим узорцима израчуната је на основу површине пика добијеног на хроматограму коришћењем HP Chemstation chromatographic софтвера.

Хидролиза екстраката: За даљу идентификацију фенолних једињења екстракти су хидролизовани модификованом методом коју су описали Engida *et al.* (2013)[265], како би се добиле слободне фенолне киселине и флавоноидни агликони.

Реагенси:

1. Метанол (CH_3OH, 65%);
2. Хлороводонична киселина (HCl, 6 N);
3. Узорак – екстракти.

Поступак

Суви екстракти су реконституисани и загревани су у 40 mL 65% раствора метанола у који је додато 10 mL хлороводоничне киселине (HCl, 6 N), 1 h на 80°C, како би дошло до хидролизе гликозида до агликона. Након хлађења узорци су сонификовани 5 min, а затим им је додат метанол до укупне запремине 100 mL и профилтрирани су кроз 0.2 μm шприц-филтер за HPLC анализу.

4.4.2. LC-MS анализа биљних екстраката

Течна хроматографија – масена спектометрија (*енг.* „liquid chromatography–mass spectrometry“ – LC-MS) је техника често примењивана у аналитичкој хемији. Она комбинује способност физичког раздвајања компоненти у течној хроматографији (LC) са могућношћу масене анализе (MS). Ово је изузетно моћна анализа са високом осетљивошћу и примењује се за сепарацију, детекцију и потенцијалну идентификацију хемијских једињења одређене масе у присуству других једињења (у сложеним мешавинама једињења, као што су у овом случају биљни екстракти).

LC-DAD-MS^n анализа екстраката испитиваних биљака из рода *Filipendula* изведена је коришћењем Ultimate 3000 UHPLC-DAD (*енг.* „ultra high performance liquid chromatography–mass spectrometry) инструмента (Thermo Scientific, Bremen, Немачка) снабдевеног LTQ-XL масеним спектрометром (Thermo Scientific, Bremen, Немачка). За хроматографско раздвајање коришћена је аналитичка колона Kinetex C18 100 Å, величине честица 1.7 µm и димензија 100 × 2.1 mm (Phenomenex). Температура колоне подешена је на 40°C. Мобилна фаза се састојала од 0.4% воденог раствора мрављe киселине (фаза A) и 0.4% мрављe киселине у ацетонитрилу (фаза B), при чему је подешен проток мобилне фазе на 0.35 mL/min у следећем градијентном програму: 0-35 min 5-18% A; 35-40 min 18-100% A; 40-50 min 100% B; 50-51 min 100-5% B ; 51-60 min рееквилибрација до 100% A). Проток растварача је одржаван на 0.35 mL/min и запремина инјектирања је подешена на 5 µL. За масену спектрометрију коришћен је LTQ-XL масени спектрометар са следећим подешавањима: температура грејача 250°C, проток гаса за распршивање је подешен на 50 арбитрарних јединица (*енг.* „arbitrary units“ – AU), проток гаса који потпомаже десолватацију на 10 AU, извор напона на 3.00 kV, извор струје на 100.00 uA, капиларна температура 330°C и капиларни напон 16.00 V. Подаци о масеној спектрометрији добијени су у негативном режиму, у *m/z* опсегу од 100 до 2000. За UHPLC-DAD-MS^n анализу, суви екстракти су растворени у метанолу у концентрацији 5 mg/mL, пре анализе профилтрирани кроз филтер-дискове, и потом је инјектирано 5 µL ових раствора. Такође, припремљени су метанолни раствори референтних фенолних једињења у концентрацији 1 mg/mL (метанол LC-MS чистоће). Референтна једињења коришћена у анализи су: (-)-епикатехин, (+)-катехин, рутин, кверцитрин, изокверцитрин, хиперозид (Carl Roth, Karlsruhe, Немачка) и спиреозид (Extrasynthese, Genay, Француска).

Како наведеном методом није било могуће на најефикаснији начин раздвојити и детектовати пикове једињења из екстраката биљке *F. hexapetala* (FHA и FHR), за њихову анализу употребљена је течна хроматографија са масеном спектрометријом високе резолуције (UHPLC-DAD-HRMS). И у овом случају коришћен је инструмент за течну хроматографију Ultimate 3000 UHPLC-DAD (Thermo Scientific, Бремен, Немачка), али је овога пута он повезан са масеним спектрометром високе резолуције QExactive HR mass spectrometer (Thermo Scientific, Бремен, Немачка). Употребљена је иста аналитичка колона, са истом мобилном фазом чији је проток дефинисан на идентичан начин. Запремина инјектирања је овога пута подешена на 10 µL, а концентрација екстраката била је такође 5 mg/mL. Температура грејача у спектрометру била је 400°C, проток гаса за распршивање 47.5 AU, проток гаса за десолватацију 11.25 AU, извор напона 2.50 kV, извор струје 400.00 uA, капиларна температура 256°C и капиларни напон 16.00 V. Подаци о масеној спектрометрији добијени су у ESI негативном режиму, у *m/z* опсегу од 133.4 до 2000. Идентификација фенолних једињења у екстрактима извршена је, или поређењем са наведеним референтним стандардима, или поређењем података MS^n фрагментације са литературним подацима за одговарајућа једињења. У овом другом случају, идентификација се може сматрати само као условна и постојање структурних изомера се не може искључити.

4.5. Испитивање антиоксидативне активности

4.5.1. Укупна антиоксидативна активност

Фосфор-молибденска метода[266] коришћена је за одређивање укупног антиоксидативног потенцијала метанолних екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala*. Ова метода базира се на томе да, у присуству антиоксиданта, у киселој средини, долази до редукције Mo(VI) из смеше реагенаса до Mo(V) уз формирање фосфат-Mo(V) комплекса зелене боје, чија се апсорбанца може мерити на 695 nm. Као стандардни антиоксидант коришћена је аскорбинска киселина.

Реагенси:

1. Реагенс раствор: прави се растварањем натријум фосфата (Na_3PO_4, 28 mM) и амонијум молибдата ($(NH_4)_2MoO_4$, 4 mM) у сумпорној киселини (H_2SO_4, 0.6 M);
2. Стандардни раствор аскорбинске киселине (0.3 mg/mL);
3. Раствори екстраката (1 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Разблажења раствора аскорбинске киселине за стандардну праву направљена су у распону концентрација од 0.1 до 0.3 mg/mL. У 0.3 mL узорка (екстракти и стандард) дода се 3 mL реагенса. Упоредо се припрема и слепа проба, где се уместо узорка додаје метанол. Након инкубације на 95°C у трајању од 90 min узорци се охладе до собне температуре. Апсорбанца узорака мерена је спектрофотометријски на 695 nm, у односу на слепу пробу.

Укупна антиоксидативна активност изражена је у еквивалентима аскорбинске киселине по граму сувог екстракта (mg AKE/g екстракта, $y = 0.003x - 0.007$), као средња вредност три независна мерења (± С.Д.).

4.5.2. Одређивање способности неутрализације DPPH· радикала

DPPH метода[267] је јако популарна у испитивањима антиоксидативне способности природних производа. Један од разлога је тај што је метода изузетно једноставна и осетљива. Ова метода је базирана на принципу донора водоника као антиоксиданта, при чему се мери способност неутрализације слободних радикала. На *Схеми 4.2.* приказан је механизам по коме DPPH· радикал прима један атом водоника од антиоксиданта и на тај начин се неутралише и стабилизује. DPPH· радикал је један од ретких стабилних и комерцијално доступних органских азотних радикала, љубичасте је боје и има апсорпциони максимум на 517 nm. У реакцији неутрализације, након преузимања атома водоника од антиоксиданта, добија се стабилно једињење 2,2-

дифенил-1-пикрилхидразил, а боја прелази из љубичасте у жуту. Антиоксидативна активност је пропорционална смањењу апсорбанце мерене спектрофотометријски на 517 nm.

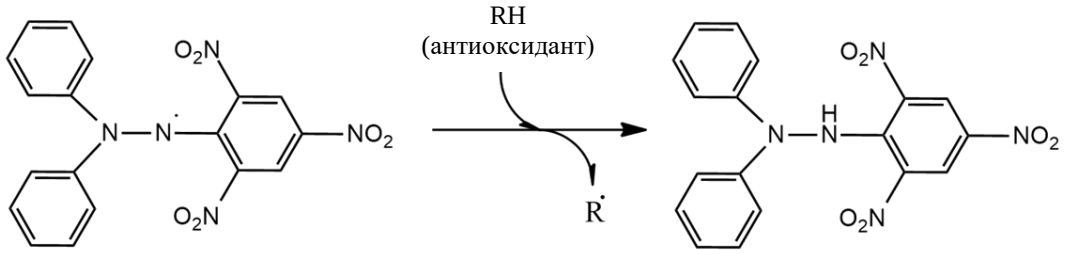


Схема 4.2. Реакција антиоксиданта (RH) са 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикалом

Реагенси:

1. 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал (DPPH˙, 80 μg/mL, у метанолу);
2. Раствори стандардних антиоксиданата (0.2 mg/mL, у метанолу);
3. Раствори екстраката (2 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Од раствора узорака (екстраката и стандарда) направљена је серија од 10 дуплих разблажења запремине 1 mL. У 1 mL узорка се дода 1 mL раствора DPPH˙. Упоредо се припрема и контрола са метанолом уместо узорка. Затим се реакциона смеша остави у мраку 30 min и способност неутрализације DPPH радикала одређује се мерењем апсорбанце на 517 nm. Све радне пробе и контроле испитане су у три понављања.

Проценат неутрализације DPPH радикала се израчунава помоћу формуле (3):

$$\%\ \text{Неутрализације} = \frac{\text{Ак}-\text{Ау}}{\text{Ак}} \cdot 100 \qquad (3)$$

Где је: Ак - апсорбанца контроле; Ау - апсорбанца узорка.

Крива зависности процента неутрализације од концентрације узорака коришћена је при рачунању IC_{50} вредности која се дефинише као концентрација испитиваног узорка која инхибира дејство слободних радикала за 50%, изражена као μg/mL екстракта. IC_{50} вредност израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*" криве поступком нелинеарне регресије, коришћем софтвера за анализу података OriginPro 8.

4.5.3. Одређивање капацитета „хватања" $ABTS^{+\cdot}$ радикал катјона

Још једна изузетно често коришћена метода за одређивање антиоксидативне активности природнох производа и синтетичких једињења је $ABTS^{+\cdot}$ метода коју су описали Re *et al*.[268]

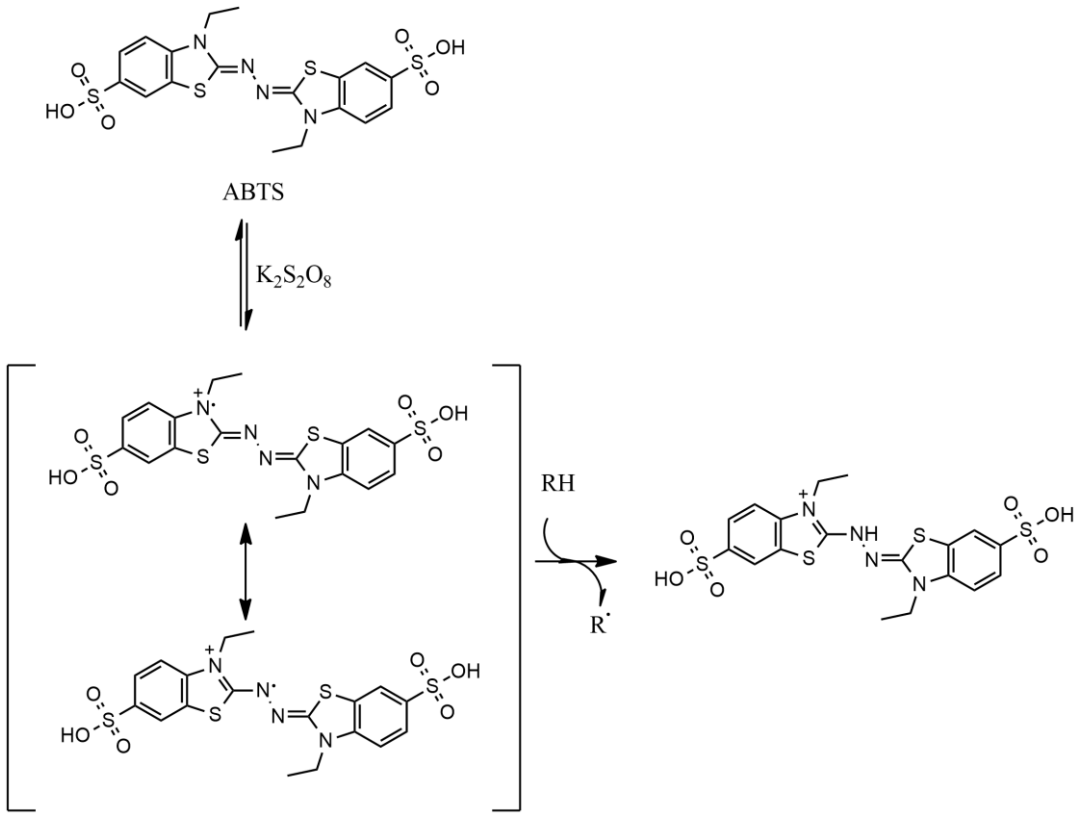


Схема 4.3. Добијање $ABTS^{+\cdot}$ оксидацијом ABTS-а са калијум персулфатом и његова реакција са антиоксидантом (RH)

Ова метода може се користити, како за испитивање активности хидрофилних, тако и за липофилне антиоксиданте. Заснива се на праћењу деколоризације раствора стабилног 2,2´-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат) радикал катјона ($ABTS^{+\cdot}$), добијеног оксидацијом ABTS-а са калијум персулфатом, у присуству неког антиоксиданта као донора водоника (*Схема 4.3.*). Реаговањем антиоксиданата са $ABTS^{+\cdot}$ радикал катјоном тамно зелена боја раствора се обезбојава, а смањење апсорбанце се може пратити спектрофотометријски на 734 nm.

Реагенси:

1. Раствор $ABTS^{+\cdot}$ (водени раствор амонијумове соли 2,2´-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфоната) (ABTS, 7 mM) помеша се са раствором калијум персулфата ($K_2S_2O_8$, 2.45 mM) и остави у мраку на собној температури у периоду од 16 h да се реакција одвије);
2. Раствори стандардних антиоксиданата (0.2 mg/mL, у метанолу);
3. Раствори екстраката (2 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Раствор добијеног $ABTS^{+\cdot}$ се прво разблажи метанолом, тако да се добије радни раствор чија је апсорбанца 0.7 на 734 nm. Од раствора узорака (екстраката и стандарда)

направљена је серија од 10 дуплих разблажења запремине 100 μL. У 100 μL узорка се дода 900 μL радног раствора $ABTS^{+\cdot}$. Упоредо се припрема и контрола са метанолом уместо узорка. Затим се реакциона смеша остави у мраку 30 min и способност „хватања“ $ABTS^{+\cdot}$ одређује се мерењем апсорбанце на 734 nm. Све радне пробе и контроле испитане су у три понављања.

Проценат инхибиције ABTS радикал катјона се израчунава помоћу формуле (4):

$$\%\ \text{Инхибиције} = \frac{\text{Ак}-\text{Ау}}{\text{Ак}} \cdot 100 \qquad (4)$$

Где је: Ак - апсорбанца контроле; Ау - апсорбанца узорка.

Крива зависности процента неутрализације од концентрације узорака коришћена је при рачунању IC_{50} вредности, на исти начин као што је приказано у претходној методи одређивања неутрализације DPPH радикала.

4.5.4. Одређивање капацитета „хватања“ $O_2^{\cdot-}$ радикала

За испитивање капацитета екстраката да „хватају“ супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$) коришћена је метода са алкалним диметил сулфоксидом (DMSO).[269] Ова метода је базирана на стварању супероксид радикала додавањем натријум хидроксида у ваздухом засићени DMSO. Настали супероксид остаје стабилан у раствору и редукује нитро плаво тетразолијум (*енг.* „nitrobluetetrazolium“ – NBT) у формазански облик на собној температури, при чему се апсорбанца насталог једињења може пратити на 560 nm (*Схема 4.4.*).

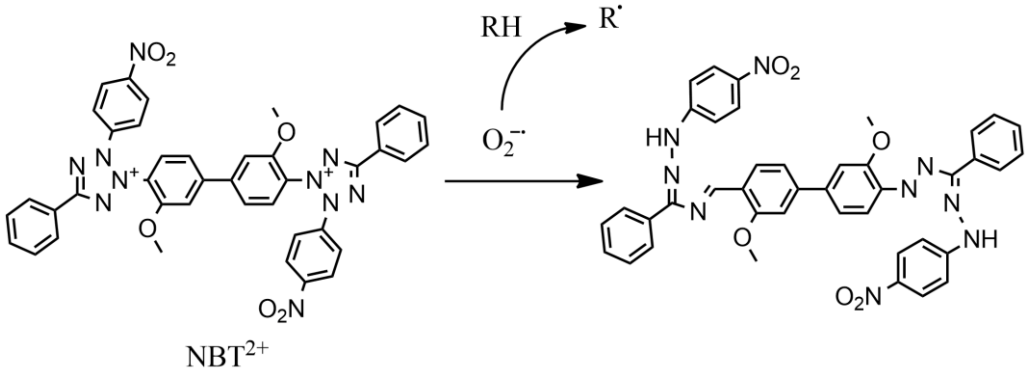


Схема 4.4. Реакција супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$) са NBT-ом и антиоксидантом (RH)

Реагенси:

1. Нитро плаво тетразолијум (NBT, 1 mg/mL, у DMSO-у);
2. Алкални DMSO (натријум хидроксид 0.2 mg/mL, у DMSO-у);
3. Раствори стандардних антиоксиданата (2 mg/mL, у DMSO-у);
4. Раствори екстраката (4 mg/mL, у DMSO-у).

Поступак:

Од раствора узорака (екстраката и стандарда) направљена је серија од 10 дуплих разблажења запремине 0.3 mL. У 0.3 mL узорка се дода 1 mL алкалног DMSO-а и 0.1 mL NBT-а. Упоредо се припрема и контрола са DMSO-ом уместо узорка. Способност „хватања“ $O_2^{\cdot-}$ радикала одређује се мерењем апсорбанце на 560 nm. Све радне пробе и контроле мерене су у три понављања.

Проценат инхибиције $O_2^{\cdot-}$ радикала се израчунава помоћу формуле (5):

$$\%\ \text{Инхибиције} = \frac{\text{Ау}-\text{Ак}}{\text{Ау}} \cdot 100 \qquad (5)$$

Где је: Ак - апсорбанца контроле; Ау - апсорбанца узорка.
IC_{50} вредност израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*” криве поступком нелинеарне регресије, коришћем софтвера за анализу података OriginPro 8.

4.5.5. Одређивање капацитета „хватања“ NO· радикала

Једна од метода које се користе за испитивање капацитета „хватања“ реактивних азотних врста је базирана на синтетисању $NO^{\cdot}$ радикала и мерењу његове концентрације коришћењем Грисовог (Griess-овог) реагенса. Методу су описали Green *et al.* (1982).[270] Griess-ова реакција је публикована још 1879. године и у основи механизма ове реакције је реакција нитрита са амино групом сулфанилне киселине у киселим условима, при чему настаје диазонијум катјон који се куплује са α-нафтиламином у *p*-положају градећи азо остатак. Новија модификована метода (*Схема 4.5.*), која је најчешће у употреби, такође захтева присуство киселе средине. Нитрит реагује са амино групом сулфаниламида и настаје диазонијум катјон који се куплује са N-(1-нафтил)етилендиамином у *p*-положају градећи одговарајући азо остатак пурпурно розе боје чија се апсорбанца може измерити на 546 nm.[271]

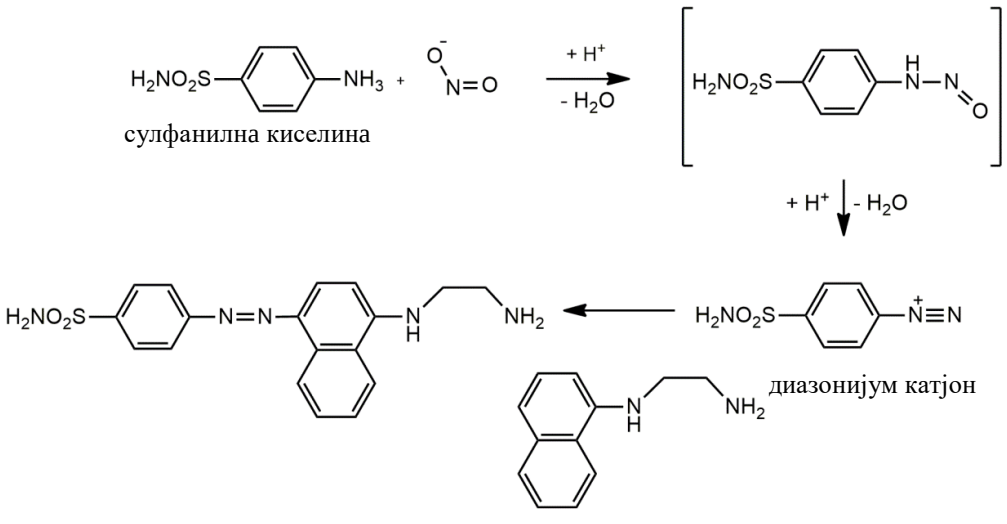


Схема 4.5. Механизам модификоване Griess-ове реакције

Реагенси:

1. Griess-ов реагенс (разблажен у дестилованој води 1:10, састав: 1% сулфаниламид, 2% ортофосфорна киселина и 0.1% N-(1- нафтил)етилендиамин дихидрохлорид);
2. PBS пуфер (*енг.* „phosphate buffer saline“, 50 mM, pH 7.4);
3. Натријум нитропрусид ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$, 5 mM у PBS пуферу);
4. Раствори стандардних антиоксиданата (0.1 mg/mL, у метанолу);
5. Раствори екстраката (2 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Од раствора узорака (екстраката и стандарда) направљена је серија од 8 дуплих разблажења запремине 0.5 mL. Упоредо се припрема и контрола са метанолом уместо узорка. Додаје се 0.5 mL натријум нитропрусида и врши инкубација 2.5 h на 25°C. Потом се дода 1 mL Griess-овог реагенса и реакциона смеша се инкубира додатних 30 min на истој температури. Апсорбанца награђеног једињења пурпурно розе боје мери се на 546 nm. Све радне пробе и контроле мерене су у три понављања.

Проценат инхибиције $NO^{\cdot}$ радикала се израчунава помоћу формуле (4):

$$\%\ \text{Инхибиције} = \frac{\text{Ак}-\text{Ау}}{\text{Ак}} \cdot 100 \qquad (4)$$

Где је: Ак - апсорбанца контроле; Ау - апсорбанца узорка.
IC_{50} вредност израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*” криве поступком нелинеарне регресије, коришћем софтвера за анализу података OriginPro 8.

4.5.6. Редуктивна активност

Поред више различитих механизама деловања антиоксиданата на слободне радикале, изузетно је значајна и способност антиоксиданта да се оксидује, односно да поседује способност да може редуковати супстрат са којим реагује. За одређивање редуктивне активности екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* коришћена је метода ферицијанид/прусијско плаво[272] која се заснива на редукцији Fe^{3+} у Fe^{2+} у присуству антиоксиданта у киселим условима, при чему се формира комплекс $KFe[Fe(CN)_6]$ познат под називом прусијско плаво са λ_{max} = 700 nm.

$$[Fe(CN)_6]^{3-} + ArOH \rightarrow [Fe(CN)_6]^{4-} + ArO^{\bullet} + H^+$$
$$[Fe(CN)_6]^{4-} + Fe^{3+} + K^+ \rightarrow KFe[Fe(CN)_6]$$

Реагенси:

1. Натријум фосфатни пуфер (pH 6.6);
2. Калијум хексацијаноферат ($K_3[Fe(CN)_6]$, 1%);
3. Трихлорсирћетна киселина (TCA, 10%);
4. Гвожђе трихлорид ($FeCl_3$, 0.1%);
5. Раствори стандардних антиоксиданата (0.2 mg/mL, у метанолу);

6. Раствори екстраката (0.2 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Од раствора узорака (екстраката и стандарда) направљена је серија од 8 дуплих разблажења запремине 2.5 mL. Упоредо се припрема и контрола са метанолом уместо узорка. У 2.5 mL узорка се дода 2.5 mL натријум фосфатног пуфера, затим се дода 2.5 mL $K_3[Fe(CN)_6]$ и након тога се смеша загрева 20 min на температури 50°C. По завршеној инкубацији у реакциону смешу се дода 2.5 mL TCA (у случају настанка талога центрифугира се 8 min на 1000 o/min). У 5 mL центрифугиране смеше дода се 1 mL $FeCl_3$ и апсорбанца насталог плавог једињења мери се на 700 nm.

Резултати редуктивне активности испитиваних узорака изражавају се преко графика зависности апсорбанце од концентрације узорка. Већа вредност апсорбанце указује на виши редуктивни капацитет узорка.

4.5.7. Капацитет хелатације

Капацитет хелатације испитиваних екстраката одређиван је методом по Yan *et al.* (2006)[273]. Метода се заснива на мерењу степена хелатације гвожђе(II) јона. Један од механизама антиоксидативне активности је управо и хелатација прелазних метала при чему се спречава разградња водоник пероксида и реакције Фентоновог типа. У присуству хелатационих агенаса, настајање комплекса је нарушено, што води до смањења интензитета боје самог раствора које се прати спектрофотометријски. Мерење редукције интензитета боје омогућава одређивање хелатационе активности коегзистирајућих хелатора (узорка). Јони прелазних метала (Fe^{2+}) поседују способност преноса једног електрона на основу чега се омогућава иницијација и пропагација многих радикалских реакција, које почињу и са релативно нереактивним радикалима.[274] У овој методи ферозин реагује са Fe^{2+} јонима, при чему настаје стабилни хидросолубилни црвени комплекс. Хелатациони капацитет испитиваног антиоксиданта огледа се у смањењу апсорбанце гвожђе(II)-ферозин комплекса на 562 nm.

Реагенси:

1. Хидрат мононатријумове соли 3-(2-пиридил)-5,6-дифенил-1,2,4-триазин-*p*,*p*′-дисулфонске киселине (ферозин, 0.3125 mM);
2. Гвожђе сулфат ($FeSO_4$, 0.125 mM);
3. Раствори стандардних антиоксиданата (1 mg/mL, у метанолу);
4. Раствори екстраката (4 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Од раствора узорака (екстраката и стандарда) направљена је серија од 10 дуплих разблажења запремине 1 mL. Упоредо се припрема и контрола са метанолом уместо

узорка. У 1 mL узорка дода се 1 mL $FeSO_4$ и 1 mL ферозина и након 10 min мерена је апсорбанца реакционе смеше на 562 nm.

Капацитет хелатизације антиоксиданта (%) се израчунава помоћу формуле (6):

$$\%\ \text{Капацитет хелатизације} = \frac{\text{Ак}-\text{Ау}}{\text{Ак}} \cdot 100 \qquad (6)$$

Где је: Ак - апсорбанца контроле; Ау - апсорбанца узорка.

IC_{50} вредност израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*" криве поступком нелинеарне регресије, употребом софтвера за анализу података OriginPro 8.

4.5.8. Одређивање инхибиције липидне оксидације

Тестови који се користе за мерење антиоксидативног потенцијала, у погледу инхибирања липидне оксидације, обухватају одређивање степена оксидације липидног супстрата у присуству или одсуству потенцијалног молекула антиоксиданта или биљног екстракта. Брза и поуздана евалуација маркера оксидације у смислу специфичности и репрезентативности оксидационог процеса би била добра стратегија мерења. Међутим, у хемијском смислу, проблем код имплементирања такве методе се односи пре свега на стварни механизам оксидације. У практичном смислу, четири различите стратегије мерења могу се користити за директну процену антиоксидативног капацитета неког молекула или екстракта у односу на липидни супстрат. То укључује мерење: (1) потрошње кисеоника, (2) губитка супстрата, и формирања (3) примарних и/или (4) секундарних производа оксидације.[275]

Праћење и одређивање оксидативне деградације липида у реалним системима, као што је храна или неки биолошки узорак, представља изузетно компликован процес. У овим комплексним системима јако је тешко идентификовати молекуле који су потенцијално подложни оксидацији. Такође, присуство интерферирајућих супстанци може значајно утицати на сам процес анализирања. Узимајући у обзир ова ограничења, у овом случају коришћена су три модел система прилагођена за одређивање степена оксидације, при чему је у прве две методе коришћен један, у потпуности окарактерисан супстрат, док је у трећем случају за одређивање степена инхибиције липидне оксидације употребљен модел систем где је као супстрат коришћено свеже месо. Овакав мултидисциплинарни приступ може прецизније дати увид у способности испитиваних екстраката да, као антиоксиданти, инхибирају процес липидне оксидације.

4.5.8.1. Гвожђе-тиоцијанатна (FCT) метода (модел систем емулзија уље/вода)

Липидни пероксиди представљају примарне производе оксидације липида. За одређивање пероксидних вредности липида, односно детерминацију инхибиције липидне пероксидације од стране антиоксиданата, примењена је гвожђе-тиоцијанатна (FCT) колориметријска метода.[276] Ова метода је базирана на чињеници да редукцију

хидропероксида може пратити реакција оксидације Fe^{2+} у Fe^{3+}, а Fe^{3+} се даље може одредити као гвожђе-тиоцијанат (*реакције I-III*). Прецизније, у присуству хидропероксида, феро јон из $FeSO_4$ или $FeCl_2$ се оксидује у фери јон који ступа у реакцију са NH_4SCN и долази до настанка црвене гвожђе-тиоцијанатне хромофоре која апсорбује на 500 nm. Што је интензитет апсорбанце већи, то је већа и количина пероксида у узорку. Последњих година, услед високе сензитивности, повећана је примена ове методе при одређивању липидне оксидације, нарочито у модел системима емулзија.

$$ROOH + Fe^{2+} \rightarrow RO^{\cdot} + Fe^{3+} \qquad (I)$$
$$RO^{\cdot} + Fe^{2+} + H^{+} \rightarrow ROH + Fe^{3+} \qquad (II)$$
$$Fe^{3+} + 5SCN^{-} \rightarrow Fe(SCN)_5^{2-} \qquad (III)$$

Реагенси:

1. Емулзија линолне киселине (0.2 M, 0.2804 g линолне киселине и 0.2804 gTween-40, као емулгатора, се хомогенизује у 50 mL фосфатног пуфера, 0.2 M, pH 7.0);
2. Етанол (75%);
3. Амонијум тиоцијанат (NH_4SCN, 30%);
4. Гвожђе сулфат ($FeSO_4$, 20 mM, растворен у 3.5% HCl);
5. Раствори стандардних антиоксиданата (0.2 mg/mL, у метанолу);
6. Раствори екстраката (2 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Од раствора узорака (екстраката и стандарда) направљена је серија од 10 дуплих разблажења запремине 0.5 mL. Упоредо се припрема и контрола са метанолом уместо узорка. У 0.5 mL узорка дода се 2.5 mL емулзије линолне киселине и потом се реакциона смеша инкубира 72 h на 37°C у мраку. Након инкубације, аликвот од 0.1 mL смеше се одвоји и у њега се дода 4.7 mL етанола, 0.1 mL NH_4SCN и 0.1 mL $FeSO_4$. После 3 min интензивног мешања, мери се апсорбанца црвено обојеног производа на 500 nm.

Инхибиција липидне пероксидације у модел систему уље/вода (%) се израчунава помоћу формуле (4):

$$\% \text{ Инхибиције} = \frac{Ак - Ау}{Ак} \cdot 100 \qquad (4)$$

Где је: Ак - апсорбанца контроле; Ау - апсорбанца узорка.
IC_{50} вредност израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*" криве поступком нелинеарне регресије, у софтверу за анализу података OriginPro 8.

4.5.8.2. β-каротен/линолна киселина модел систем

Антиоксидативна активност у липидним системима се такође може одредити на основу оксидативне деградације β-каротена у емулзији β-каротен/линолна киселина, која се може пратити спектрофотометријски на 470 nm.[277] β-каротен се у овом случају

користи као погодан супстрат полиенске структуре са апсорбанцом у UV–VIS области, тако да се сам процес деградације може лако пратити спектрофотометријски.

Реагенси:

1. Емулзија β-каротен/линолна киселина (2 mL раствора β-каротена у хлороформу (0.2 M) дода се у 40 mg линолне киселине уз додатак 400 mg Tween-а 40 као емулгатора, хлороформ се уклони на вакууму, дода се 100 mL воде и смеша добро промућка);
2. Раствори стандардних антиоксиданата (0.2 mg/mL, у метанолу);
3. Раствори екстраката (1 mg/mL, у метанолу).

Поступак:

Од раствора узорака (екстраката и стандарда) направљена је серија од 10 дуплих разблажења запремине 0.2 mL. Упоредо се припрема и контрола са метанолом уместо узорка. У 0.2 mL узорка дода се 4.8 mL свеже припремљене емулзије. Апсорбанца се мери одмах на 470 nm, а потом се узорци инкубирају 60 min у воденом купатилу на температури од 50°C. Након једночасовне инкубације, апсорбанца је поново мерена на истој таласној дужини.

Инхибиција липидне пероксидације у модел систему β-каротен/линолна киселина (%) се израчунава помоћу формуле (7):

$$\%\ \text{Инхибиције} = \frac{Dk-Du}{Dk}\cdot 100 \qquad (7)$$

$$Dk = \ln\left(\frac{a}{b}\right)/60; \qquad Du = \ln\left(\frac{a}{b}\right)/60$$

Где је: *Dk* – степен деградације контроле; *Du* – степен деградације узорка; *a* – почетна вредност апсорбанце на 0 min; *b* – вредност апсорбанце на 60 min.

IC_{50} вредност израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*" криве поступком нелинеарне регресије, применом софтвера за анализу података OriginPro 8.

4.5.8.3. Инхибиција липидне оксидације у месу (месо – модел систем)

Оксидације је један од најчешћих немикробних узрока смањења квалитета свежег меса. Оксидативни стрес води стварању повећане количине реактивних кисеоникових и азотових врста (ROS и RNS), а самим тим долази и до оштећења макромолекула у месу, пре свега липида и протеина. У прехрамбеној индустрији у употреби је велики број адитива и синтетичких антиоксиданата, као што је БХА и БХТ, који продужавају век трајања прехрамбеним производима (нарочито месним производима), али са друге стране многа од ових једињења поседују изузетну токсичност. Из тог разлога, индустрија је кренула у потрагу за решењем у виду природних антиоксиданата, најчешће екстраката лековитог и зачинског биља, и једињења биљног порекла, која би очувала квалитет меса.[278]

Метода коју су описали Wettasinghe и Shahidi (1999)[279], са незнатним изменама, коришћена је за одређивање инхибиције липидне пероксидације екстраката биљака у месо-модел систему. Одређена количина млевеног меса је третирана растворима екстраката у две концентрације (100 и 500 mg/kg) и раствором БХТ-а (50 mg/kg). Производи липидне пероксидације у месу (TBARS – тиобарбитурна киселина реагујуће супстанце) одређивани су у дефинисаном временском интервалу (0-14 дана), а резултати су изражени у еквивалентима малондиалдехида, једног од главних продуката липидне пероксидације.

Реагенси:

1. Бутиловани хидрокси-толуен (БХТ у води);
2. Раствори екстраката (у води);
3. Трихлорсирћетна киселина (TCA, 10%);
4. Реагенс тиобарбитурне киселине (0.8% TBA раствори се у 1.1% SDS – натријум додецил сулфата);
5. Стандардни раствор малондиалдехида (MDA, 30 μM).

Поступак:

Свеже свињско месо, коме је уклоњена сва видљива маснођа, самлевено је у машини за млевење меса (два пута) и подељено је на једнаке делове тако да је укупна маса за сваки део 500 g. Формирано је 10 група: I група је служила као негативна контрола (месо је помешано само са дестилованом водом, 20% од укупне тежине узорка; II група је служила као позитивна контрола (месо је третирано са БХТ-ом у концентрацији од 50 mg/kg раствореног у истој запремини воде); III и IV група третиране су FUA екстрактом у концентрацијама од 100 и 500 mg/kg, растворeним у датој запремини воде; V и VI група третиране су FUR екстрактом (100 и 500 mg/kg, у води); VII и VIII група третиране су FHA екстрактом (100 и 500 mg/kg, у води); и IX и X група третиране су FHR екстрактом (100 и 500 mg/kg у води). Третирани узорци меса из свих група су добро хомогенизовани, стављени у пластичне кесе и чувани у фрижидеру на 4°C, у временском периоду од 14 дана. Након унапред дефинисаног времена (на 0, 1, 2, 3, 7, 9, 11 и 14 дана), узорци од сваке групе су насумично узимани ради одређивања нивоа липидне пероксидације TBARS методом по Siu и Draper (1978).[280] Узорцима меса (2 g) додато је 5 mL TCA и интензивно је мешано 5 min, затим је додато 5 mL TBA реагенса и поново мешано 1 min. Узорци се потом центрифугирају 10 min на 4000 o/min и добијени супернатанти се профилтрирају. Епрувете са супернатантима се поставе у кључало водено купатило на 45 min, након истека овог времена охладе на собну температуру, по потреби поново центрифугирају и затим се очитава апсорбанца комплекса TBA-малондиалдехид на 532 nm.

Степен липидне пероксидације у узорку меса израчунат је на основу стандарне праве раствора малондиалдехида (MDA) помоћу једначине праве ($y = 559.9x + 0.029$; R^2

= 0.998). Резултат је изражен као средња вредност пет независних мерења (± С.Д.), у еквивалентима малондиалдехида по килограму узорка меса (mg MDA/kg меса).

4.5.9. Испитивање стабилности биљних екстраката

4.5.9.1. Испитивање стабилности у зависности од промене pH вредности

Стабилност биљних екстраката при промени pH вредности средине одређена је методом коју су описали Kittiphattanabawon *et al*. (2012)[281], а резултати су изражени као релативна антиоксидативна активност у односу на промену садржаја укупних фенолних једињења у узорцима и антиоксидативну активност на нивоу DPPH$^{\bullet}$ радикала.

Реагенси:

1. Суви екстракти;
2. Хлороводонична киселина (HCl, 1 M);
3. Натријум хидроксид (NaOH, 1 M);
4. Реагенси за одређивање укупних фенолних једињења;
5. Реагенси за одређивање антиоксидативне активности на нивоу DPPH$^{\bullet}$ радикала.

Поступак:

Суви екстракти се растворе у 25 mL дестиловане воде, чија је pH вредност претходно подешена на 1, 3, 5, 7 и 9 коришћењем 1 M HCl или 1 M NaOH. Циљ је добити пет раствора екстраката концентрације 2 mg/mL са различитим pH вредностима. Раствори су инкубирани 1 h на собној температури, а након инкубације pH свих раствора подешена је на pH 7.0 и запремина је допуњена дестилованом водом до 50 mL. У добијеним растворима одређивана је релативна антиоксидативна активност, и то мерењем садржаја укупних фенолних једињења у узорцима, као и одређивањем способности неутрализације DPPH$^{\bullet}$ радикала, методама претходно описаним у овом раду.

Релативна антиоксидативна активност (RAA) на нивоу DPPH$^{\bullet}$ радикала изражава као проценат активности у односу на антиоксидативну активност узорка пре икаквог третмана, а израчунава се коришћењем једначине (8):

$$\% RAA = \frac{A \times 100}{B} \qquad (8)$$

где је A – % антиоксидативне активности узорка који је третиран, B – % антиоксидативне активности узорка без икаквог третмана.

4.5.9.2. Испитивање стабилности у зависности од промене температуре

Термална стабилност биљних екстраката, односно промена способности екстраката да делују као антиоксиданти, испитана је методом Kittiphattanabawon *et al*. (2012).[281]

Реагенси:

1. Раствори екстраката (5 mg/mL, у води);
2. Хлороводонична киселина (HCl, 1 M);
3. Натријум хидроксид (NaOH, 1 M);
4. Реагенси за одређивање укупних фенолних једињења;
5. Реагенси за одређивање антиоксидативне активности на нивоу DPPH$^{\bullet}$ радикала.

Поступак:

Аликвоти од 10 mL раствора екстраката су узети, подешена им је pH вредност на 7.0 и запремина је допуњена дестилованом водом до укупно 50 mL. По 10 mL сваког раствора је пренето у стаклене епрувете са запушачем, које су потом смештене у кључало водено купатило (температура око 100°C) на тачно дефинисане временске интервале од 0, 15, 30, 60, 120, 180 и 240 min. Након унапред одређеног временског периода загревања, епрувете се узимају из воденог купатила и одмах хладе у леденој води. У добијеним узорцима одређивана је релативна антиоксидативна активност при изложености високој температури. Одређиван је садржај укупних фенолних једињења у узорцима и способност неутрализације DPPH$^{\bullet}$ радикала.

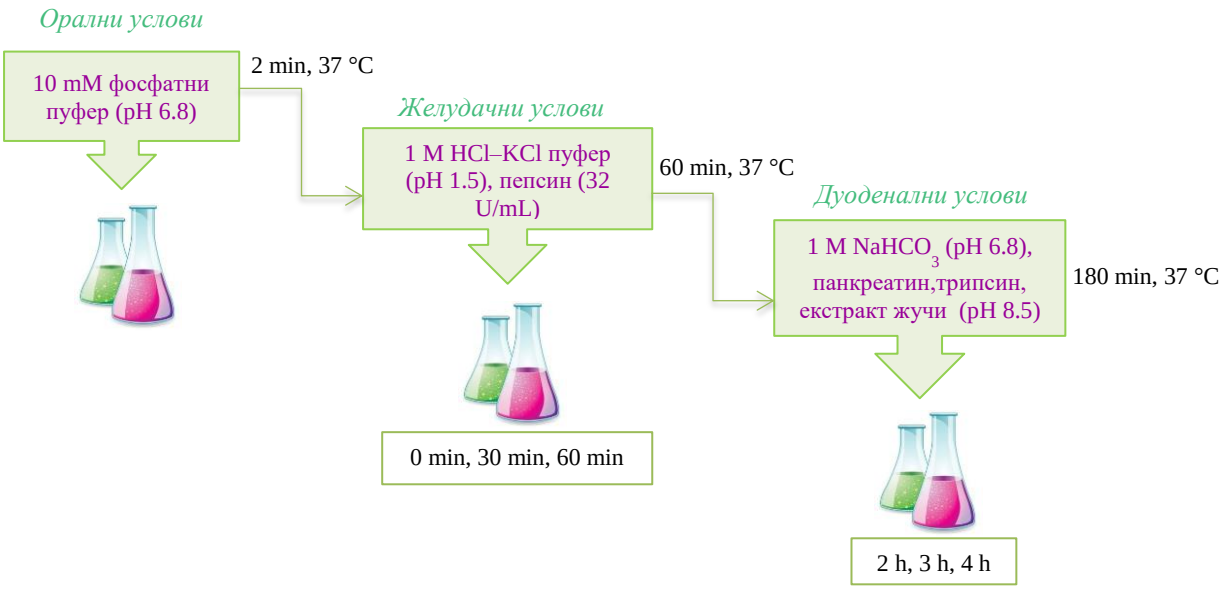
Релативна антиоксидативна активност (RAA) на нивоу DPPH$^{\bullet}$ радикала изражава као проценат активности у односу на антиоксидативну активност узорка на нултом времену, а израчунава се коришћењем једначине (8).

4.5.9.3. Испитивање стабилности у току in vitro дигестије

Важна особина природних антиоксиданата је њихова биолошка расположивост. У живом организму, антиоксидативна активност природних производа се испољава искључиво у зависности од њихове апсорпције, метаболизма, дистрибуције и екскреције, у ткивима и органима након ингестије. Симулирање дигестије у *in vitro* условима може помоћи разумевању процеса којима је подвргнута храна богата полифенолима након уноса у организам, а пре њене коначне екскреције.[282,283]

Гастроинтестинална дигестија (варење) испитиваних биљних екстраката симулирана је *in vitro* по методи коју су описали Enari *et al*. (2008)[284], са незнатним модификацијама. Читав процес је илустративно приказан на *Слици 4.3*. Процес дигестије се састоји из три фазе, почетне дигестије у усној дупљи, потом дигестије у

желуцу на ниским pH вредностима (кисела средина) и, на крају, варења у дуоденалним условима, при базним pH вредностима.



Слика 4.3. Протокол симулације in vitro дигестије

Реагенси:

1. Раствори екстраката (1 mg/mL, у води);
2. Фосфатни пуфер (10 mM, pH 6.8)
3. Калијум хлоридни пуфер (HCl–KCl 1 M, pH 1.5);
4. Раствор пепсина – изолован из слузокоже желуца свиња (32 U/mL, Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка, припрема се у HCl–KCl пуферу).
5. Раствор натријум хидрогенкарбоната (1 M, $NaHCO_3$);
6. Мешавина ензима панкреасног сока и екстракта жучи (садржи панкреатин (10 mg/mL, смеша протеза, амилазе, липаза и рибонуклеазе из панкреаса свиње), ензим трипсин (14 600 U/mL) и екстракт жучи (13.5 mg/mL) у 10 mM фосфатном пуферу (pH 8.2));
7. Реагенси за одређивање укупних фенолних једињења;
8. Реагенси за одређивање антиоксидативне активности на нивоу $DPPH^{\bullet}$ радикала.

Поступак:

Како би се симулирали услови варења у усној дупљи, 100 mL раствора екстраката помешано је са 10 mL фосфатног пуфера (pH 6.8) и смеше су инкубиране 2 min на 37°C. Услови у желуцу остварени су *in vitro* додавањем 0.5 mL HCl–KCl пуфера (pH 1.5) у раствор екстраката. Затим је додато 5 mL раствора пепсина и смеша је инкубирана 60 min на 37°C. Трећа фаза дигестије постигнута је неутрализацијом са $NaHCO_3$ до pH 6.8. Потом је смеши додат 1 mL мешавине екстракта жучи и панкреасног сока и вршена је инкубација у трајању од 3 h на 37°C. Током овог процеса *in vitro* дигестије аликвоти смеша екстраката узимани су ради даље анализе на 0, 0.5, 1,

2, 3 и 4 h, и епрувете су одмах стављане у кључало водено купатило на 10 min како би се инактивирали ензими присутни у смешама.

Релативна антиоксидативна активност у различитим периодима дигестије одређивана је мерењем садржаја укупних фенолних једињења у узорцима, као и одређивањем способности неутрализације DPPH$^{\bullet}$ радикала. Релативна антиоксидативна активност (RAA) на нивоу DPPH$^{\bullet}$ радикала изражава као проценат активности у односу на антиоксидативну активност узорка пре икаквог третмана, а израчунава се коришћењем једначине (8).

4.6. Испитивање антимикробне активности

4.6.1. Коришћени микроорганизми

За испитивање *in vitro* антимикробне активности метанолних екстракта надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* коришћене су серије од 6 сојева Грам-позитивних (G+) и 8 сојева Грам-негативних (G-) бактерија, прецизније њихових стандардних (ATCC) и изолованих (FSB) култура, што укупно чини 14 врста бактерија, и 11 фунгалних микроорганизама. Микроорганизми који су коришћени у овом испитивању наведени су у *Табели 4.2.*

Табела 4.2. Врсте микроорганизама коришћене за испитивање антимикробне активности

Бактерије *(ATCC културе и изолати)*	***Гљиве***
Pseudomonas aeruginosa G−, ATCC 10145	***Плесни***
Micrococcus lysodeikticus G+, ATCC 4698	*Trichoderma harzianum* FSB 12
Klebsiella pneumoniae G−, ATCC 70063	*Trichoderma longibrachiatum* FSB 13
Escherichia coli G−, ATCC 25922	*Penicillium cyclopium* FSB 23
Bacillus subtilis G+, ATCC 6333	*Penicillium canescens* FSB 24
Staphylococcus aureus G+, ATCC 25923	*Aspergillus niger* FSB 31
Pseudomonas aeruginosa G−, FSB 37	*Aspergillus glaucus* FSB 32
Pseudomonas fluorescens G−, FSB 28	*Fusarium oxysporum* FSB 91
Escherichia coli G−, FSB 41	*Alternaria alternata* FSB 51
Enterococcus faecalis G+, FSB 24	*Doratomyces stemonitis* FSB 41
Agrobacterium tumefaciens G−, FSB 11	*Phialophora fastigiata* FSB 81
Azobacter chroococum G−, FSB 14	***Квасци***
Bacillus mycoides G+, FSB 1	*Candida albicans* ATCC 10259
Staphylococcus aureus G+, FSB 30	

Стандардни сојеви бактерија (ATCC) потичу из микробиолошке лабораторије Катедре за биохемију, Хемијског факултета у Београду. Клинички изолати појединих бактеријских сојева (FSB) потичу из Института за јавно здравље у Крагујевцу. Гљиве коришћене у експерименту су добијене из Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, и део су микотеке овог института.

4.6.2. Припрема микроорганизама

Микроорганизме, који ће се користити за испитивање, је потребно пресејати на хранљиве подлоге непосредно пре њиховог коришћења за одређивање антимикробне активности. Културе бактерија пресејавају се на коси хранљиви агар (HA), подлога која се користи за пресејавање гљива је кромпир-глукозни агар, док је за пресејавање *Candida albicans* неопходан Sabouraud декстрозни агар (SDA). Засејавање (инокулација) се врши микробиолошком езом под стерилним условима. Након пресејавања, бактеријске културе се инкубирају 24 h на температури 37°C како би се развиле, док се гљиве инкубирају 48 h на 25°C.

За испитивање антимикробне активности неопходно је направити суспензије спора (инокулуме) бактерија и гљива на којима ће се тестирање вршити. Ћелије и споре микроогранизама су суспендоване у стерилном физиолошком раствору (0.9% NaCl), при чему је фотоколориметријском методом број микроорганизама стандардизован на 0.5 јединица на McFarland-овој скали. Густина инокулума је један од важнијих параметара у датом експерименту. Препоручено је да густина износи $1 \times 10^4 – 1 \times 10^6$ CFU/mL (Colony Forming Unit) за бактерије и $1 \times 10^3 – 1 \times 10^4$ CFU/mL за гљиве. Најчешће коришћен метод за стандардизацију инокулума је помоћу McFarland стандарда. Припрема ових стандарда се врши мешањем одређене запремине 1% сумпорне киселине и 1.175% баријум хлорида како би се добио раствор баријум сулфата са специфичном оптичком густином. Најчешће се користи 0.5 McFarland (99.5 mL 1% сумпорне киселине и 0.5 mL баријум хлорида). Епрувете се чувају у мраку на собној температури, а стандард одговара суспензији спора густине 1.5×10^8 CFU/mL. Одређивање густине суспензија је извршено фотоколориметријски (Iskra MA 9507), при чему се на 550 nm (зелени филтер) мери оптичка густина припремљене суспензије, уз додавање физиолошког раствора или микроорганизама у циљу постизања оптичке густине $O.D._{550nm}$= 0.045 за бактеријске културе и *C. albicans*, односно $O.D._{550nm}$= 0.03 за гљиве. Коначна концентрација инокулума бактерија и инокулума за *C. albicans* је износила 1×10^6 CFU/mL, док је густина инокулума за гљиве је износила 1×10^4 CFU/mL.

4.6.3. Микродилуциона метода

Микродилуциона метода, коју су описали Sarker *et al.* (2007)[285], заснива се на одређивању минималне инхибиторне концентрације (*енг.* „Minimum Inhibitory Conce-

ntration“ – MIC), односно минималне концентрације антимикробног једињења која инхибира раст и развој микроорганизма. У овој методи тестирање се изводи у стерилним микротитарским плочама са 96 конусних удубљења запремине 200 μL, које поседују поклопац.

4.6.3.1. Одређивање антибактеријске активности

Основа микродилуционе методе за одређивање антибактеријске активности је употреба индикатора за раст бактерије – ресазурина (7-хидрокси-3*H*-феноксазин-3-он 10-оксид). Ресазурин је оксидо-редукциони индикатор плаве боје, који се може иреверзбилно редуковати у розе обојени ресоруфин (*Схема 4.6.*). У присуству ензима митохондријалних оксидоредуктаза, као што су NADH и NADPH дехидрогеназе, у живим бактеријским ћелијама долази до редукције ресазурина и промене боје у розе, што је јасан индикатор раста бактерије.[285]

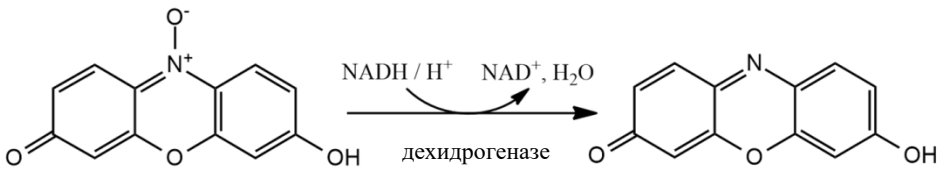


Схема 4.6. Редукција плавог индикатора ресазурина, у присуству ензима дехидрогеназа у живој бактеријској ћелији, до ресоруфина розе боје

Реагенси:

1. Müller–Hinton-ова течна подлога (стерилна; 2 g хранљивог бујона, 17.5 g хидролизата казеина и 1.5 g штирка растворити у 1 L дестиловане воде и кувати до кључања);
2. Раствори екстраката (20 mg/mL, у стерилној води);
3. Раствори стандардних фенолних једињења – гална киселина и кверцетин (2 mg/mL, у стерилној води);
4. Раствор антибиотика амрацина (10 μg/mL, у стерилној води);
5. Суспензије спора бактерија (1×10^6 CFU/mL);
6. Раствор индикатора ресазурина (6 mg ресазурина у 10 mL стерилне воде).

Поступак:

У низу удубљења на микроплочи припреме се двострука разблажења екстраката користећи течну Müller–Hinton-ову подлогу, тако да укупна запремина у свакој јамици буде 50 μL. Затим се у сваку јамицу дода 10 μL индикатора ресазурина, додатних 30 μL течне подлоге и 10 μL суспензије спора. Поред екстраката, испитивана је и антибактеријска активност стандардних антибиотика амрацина (тетрациклин), еритромицина и

хлорамфеникола. За сваку бактеријску културу испитиван је раст у две засебне јамице (позитивна контрола), а такође је испитивана и стерилност услова (контрола стерилности). Микроплоче инкубиране су 24 h на 37°C.

Свака промена боје индикатора из љубичасте у розе или безбојну бележена је као позитивна, односно указивала је на раст микроорганизма у датој јамици. Концентрација испитиваног узорка у првој јамици у низу у којој није дошло до промене боје индикатора узима се као минимална инхибиторна концентрација (MIC). Тестови су рађени у три понављања.

4.6.3.1. Одређивање антифунгалне активности

Реагенси:

1. Sabouraud-декстрозна течна подлога (стерилна; Институт за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“, Београд, Србија);
2. Раствори екстраката (20 mg/mL, у стерилној води);
3. Раствори стандардних фенолних једињења – гална киселина и кверцетин (2 mg/mL, у стерилној води);
4. Раствор антимикотика – нистатин, флуконазол, кетоконазол и клотримазол (10 μg/mL, у стерилној води);
5. Суспензије спора гљива (1×10^4 CFU/mL).

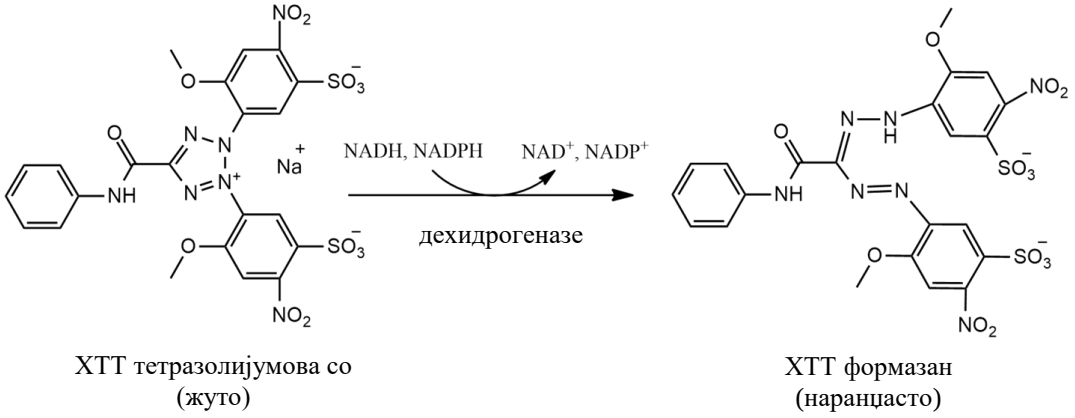
Поступак:

Као и код одређивања антибактеријске активности, у низу удубљења на микроплочи припреме се двострука разблажења узорака, с тим што се користи Sabouraud-декстрозна течна подлога, тако да укупна запремина у свакој јамици буде 50 μL. Затим се у сваку јамицу дода још 40 μL течне подлоге и 10 μL суспензије спора. Као и у претходном тесту, за сваку културу гљива испитиван је раст у две засебне јамице (позитивна контрола) и стерилност услова (контрола стерилности), такође у две јамице. Микроплоче инкубиране су 72 h на 28°C. Након инкубирања микроплоче су анализи-ране и најнижа концентрација узорка без видљивог раста микроорганизма дефинисана је као минимална инхибиторна концентрација (MIC). Сви тестови су рађени у три понављања, као и у случају испитивања антибактеријске антивности.

Постоји неколико измена у случају гљиве *C. albicans*, као подлога се користи Müller–Hinton-ова течна подлога, суспензија спора треба да буде густине 1×10^6 CFU/mL и микроплоча се инкубира 24 h на 30°C.

4.7. Испитивање цитотоксичности

Цитотоксичност метанолних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* испитивана је XTT методом.[286] Ова метода заснива се на редукцији индикатора натријумове соли 3-[1-(фениламинокарбонил)-3,4-тетразолијум]-бис(4-метокси-6-нитро)бензен сулфонске киселине (скраћено XTT), у присуству митохондријалних дехидрогеназа, при чему настаје наранџасто обојен облик XTT-формазан (*Схема 4.7.*). До ове реакције долази само у метаболички активним ћелијама, тако да је број ових ћелија у директној корелацији са променом и интензитетом боје XTT индикатора.[287]



XTT тетразолијумова со (жуто)

XTT формазан (наранџасто)

Схема 4.7. Редукција жуто обојеног XTT до наранџастог XTT-формазана, у присуству митохондријалних дехидрогеназа

4.7.1. Коришћене ћелијске линије

При одређивању цитотоксичне активности екстраката коришћене су туморске ћелије гајене на одговарајућим подлогама: хумана ћелијска линија канцера дебелог црева (*енг.* „human colon cancer cells“ – HCT-116); хумана ћелијска линија глиобластома (*енг.* „human glioblastoma cells“ – U251) и хумана ћелијска линија фибробласта плућа (*енг.* „human lung fibroblasts“ – MRC-5). HCT-116 и U251 ћелијске линије гајене су на DMEM подлози (Dulbecco´s Modified Eagle Medium, Gibco, Аустрија) са 2 mM глутамином (Sigma, MO, САД), 10% топлотно инактивираног феталног говеђег серума (FBS, PAA laboratories, Аустрија) и 1% Pen/Strep (PAA laboratories, Аустрија). MRC-5 ћелијска линија гајена је на MEM подлози (Minimum Essential Medium, Gibco, Аустрија) обогаћеној са 2 mM глутамином, 10% FBS и 1% Pen/Strep. Све ћелијске линије чуване су на 37°C при оптималној влажности, у атмосфери засићеној са 5% CO_2.

4.7.2. Испитивање антипролиферативне активности XTT методом

Испитиване ћелије засејане су у микротитарске плоче са 96 удубљења са равним дном и то, у случају HCT-116 и U251 ћелијских линија коришћена је запремина од 100 µL у концентрацији 50 000 c/mL, док је за MRC-5 ћелије коришћена иста запремина у концентрацији ћелија 100 000 c/mL. Засејане ћелије се оставе да се инкубирају на 37°C и 5% CO_2, у инкубатору преко ноћи, пре него што се додају испитиване супстанце. Након 24 h инкубације, медијум се замени са медијумом који садржи унапред дефинисане различите концентрације испитиваних супстанци. У случају екстраката коришћене су три концентрације 5.0, 10.0 и 50.0 µg/mL, а екстракти су растворени у етанолу и разблаживани дестилованом водом. Као позитивне контроле коришћена су два медицинска средства која се користе у терапији канцера, и то неорганski комплекс цисплатина (растворен у дестилованој води у концентрацијама 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 и 50 µg/mL) и органско једињење биљног порекла винбластин (растворен у дестилованој води у концентрацијама 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 10, 20 и 30 µg/mL). Контролним ћелијама додат је само свеж медијум.

Након 72 h третмана са испитиваним супстанцама, у свако удубљење додато је 50 µL свеже припремљеног XTT раствора (коришћено је 5 mL XTT и 100 µL реагенса за електронско купловање, Cell proliferation kit II (XTT), Roche Diagnostics, Немачка, Кат. бр. 11 465 015 001), и вршена је инкубација још 90 min. За то време се у удубљењима са метаболички активним ћелијама развија наранџаста боја која потиче од формазана. Апсорбанца се мери коришћењем спектрофотометра за очитавање микротитарских плоча, на таласној дужини 490 nm са референтном таласном дужином 650 nm.[288] Број вијабилних (живих) ћелија одређује се из следеће формуле (9) [286]:

$$\%\ \text{живих ћелија} = \frac{\text{апсорбанца третираних ћелија}}{\text{апсорбанца контролних ћелија}} \times 100 \qquad (9)$$

За израчунавање IC_{50} вредности коришћен је аналитички софтвер SigmaPlot 13.0 (Systat Software Inc., Немачка). Резултати су представљени као средња вредност ± С.Е.М. и ± С.Д., $n = 6$.

4.8. *In vitro* испитивање антиинфламаторне активности

4.8.1. Инхибиција ензимске активности циклооксигеназе-1 (COX-1) и циклооксигеназе-2 (COX-2)

Метода за испитивање инхибиције активности ензима циклооксигеназе-1 и циклооксигеназе-2 базирана је на формирању простагландина PGE_2 преко каскаде арахидонске киселине. Испитивање се изводи у плочама са 96 удубљења где се додају чист ензим, узорак, арахидонска киселина и друге помоћне супстанце и потом се врши инкубација. Формирани PGE_2 се, након тога, квантификује помоћу ELISA теста. Коли-

чина насталог PGE_2 даје нам информацију о способности узорка да инхибира ензиме COX-1 или COX-2.[289,290]

Реагенси:

1. Раствори екстраката (50 μg/mL, у диметил сулфоксиду (>99.8% DMSO));
2. Раствори стандардних једињења за позитивну контролу (за COX-1: индометацин 1.25 μM, у етанолу; за COX-2: NS-398 5 μM, у етанолу (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, САД));
3. Пуфер TRIS Pufferan ≥ 99.9% p.a. (TRIS/HCl-пуфер, 0.1 M, pH 8.0 (Roth, Karlsruhe, Немачка));
4. Смеша за инкубацију (0.1 M TRIS/HCl-пуфер (pH 8.0), 5 μM хематин (ICN, Aurora, Ohio, САД; 3.168 mg хематина раствори се са 500 μL 0.1 N NaOH у ултразвучном купатилу, дода се 4.5 mL TRIS-пуфера, а затим се 150 μL овог раствора суспендује у 1.5 mL TRIS-пуфера), 18 mM (-)-епинефрин (+)-битартарат (Fluka, Buchs, Швајцарска), 0.2 U ензима);
5. Раствор натријумове соли етилендиаминотетрасирћетне киселине (Na_2EDTA, 50 μM у TRIS пуферу и смеши за инкубацију (Titriplex III, Merck, Darmstadt, Немачка)), користи се само за COX-2 методу за комплексирање тешких метала;
6. Арахидонска киселина (5 μM, у смеши за инкубацију);
7. Ензимски пуфер (0.08 M TRIS-pufer, 100 mg Tween 20 (у 100 mL пуфера) и 0.3 mM натријумдиетилдитиокарбамат трихидрат ≥ 99.9% p.a. (pH 8.0));
8. Раствори ензима COX-1 и COX-2 (растворени у ензимском пуферу до активности 12 U/аликвоту) - COX-1 из семених кесица овна и хумани рекомбинантни ензим COX-2 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, САД);
9. Мравља киселина (10%, у дестилованој води, ≥98% чистоће);
10. EIA kit за ELISA анализу ((Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, САД) садржи IgG микротитарске плоче, EIA пуфер, пуфер за испирање, алкална фосфатаза PGE_2 конјугат, простагландин E_2 стандард, pNpp супстрат, стоп раствор, фолије за затварање плоча);
11. Стандарди 1-7 (стандард 1 - 1950 μL EIA пуфера и 50 μL простагландин E_2 стандарда; стандард 2 - 500 μL EIA пуфера и 500 μL стандарда 1; стандард 3 - 500 μL EIA пуфера и 500 μL стандарда 2; на исти начин припремати све стандарде све до стандарда 7 - 500 μL EIA пуфера и 500 μL стандарда 6).

Поступак:

У плочама са 96 удубљења са равним дном у свако удубљење пипетира се 10μL TRIS/HCl-пуфера (за COX-1 методу 20 μL), затим се дода 10 μL Na_2EDTA само за COX-2 методу. Након тога, додаје се 50 μL раствора епинефрина, и затим се додају узорци у запремини 10 μL. Ово је праћено додавањем 100 μL раствора ензима и 10 μL раствора хематина. Смеша се пре-инкубира 5 min, на собној температури. Затим се дода 10 μL раствора арахидонске киселине како би реакција започела, смеша се инкубира 20 min на 37ºC, на ротирајућем воденом купатилу, а формирање PGE_2 се зауставља

додатком 10 μL 10% мравље киселине. У контролна удубљења уместо узорка додато је 10 μL растварача.

Узорци са инкубационе плоче су растворени за ELISA анализу, за COX-1 методу 10 μL инкубираног узорка и 190 μL EIA пуфера, а за COX-2 методу 5 μL инкубираног узорка и 195 μL EIA пуфера.

ELISA анализа: 100 μL EIA пуфера се дода у свако удубљење на ELISA плочи, са изузетком удубљења за неспецифично везивање (*енг.* „nonspecific binding" – NSB) где се додаје 150 μL EIA пуфера. Након тога додаје се 100 μL стандарда и инкубираних узорака. Затим се дода 50 μL PGE_2 конјугата (у свако удубљење осим TA и бланко пробе) и 50 μL антитела (у свако удубљење осим NSB, TA и бланко пробе). Плоча се затвори лепљивом фолијом и инкубира 2 h на шејкеру за плоче. После инкубирања плоча се испира три пута са 200 μL пуфера за испирање, а потом се дода 5 μL PGE_2 конјугата у удубљења за укупну активност (TA). 200 μL pNpp супстрата се дода у свако удубљење и инкубира се 1 h, а реакција се зауставља додатком 50 μL стоп-раствора. Апсорбанца плоче се мери на 405 nm помоћу UV читача микротитарских плоча (Tecan Rainbow, Tecan Group Ltd., Maennedorf, Швајцарска), при чему је бланко корекција између 570 и 590 nm. Инхибиција активности COX-1 и COX-2 односи се на смањење производње PGE_2 у поређењу са бланко пробом без инхибитора. Проценат инхибиције израчунава се помоћу следеће формуле (10):

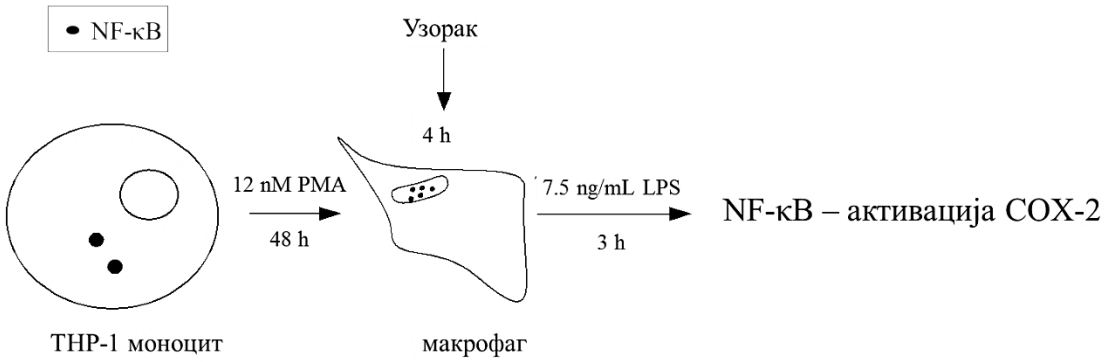
$$\% \text{ Инхибиције} = \frac{\text{Ак} - \text{Ау}}{\text{Ак}} \cdot 100 \qquad (10)$$

Где је: Ак - апсорбанца бланко пробе без инхибитора; Ау - апсорбанца узорка.

4.8.2. Инхибиција експресије NF-κB/COX-2 гена

Нуклеарни фактор κB (NF-κB) је протеински комплекс који контролише транскрипцију ДНК. Укључен је и у многе ћелијске процесе, као што су имуни одговор, инфламаторни одговор, ћелијски раст и апоптоза. NF-κB детектован је у скоро свим типовима животињских и хуманих ћелија и саставни је део ћелијског одговора на различите стимулансе, као што су оксидативни стрес, UV зрачење, бактеријски или вирусни антигени, цитокини и оксидовани LDL. NF-κB делује као транскрипциони регулатор индуковане експресије гена, укључујући и COX-2 гене, у инфламаторном процесу.[291] Инхибиција експресије COX-2 гена, стога утиче на смањење активности самог ензима, а тиме и на регулисање инфламаторног одговора.[292]

За одређивање способности инхибирања експресије NF-κB/COX-2 гена екстраката биљака коришћена је метода ланчане реакције полимеразе у реалном времену (*енг.* „Real time PCR").[287,292] Метода се заснива на индуковању диференцирања THP-1 моноцита у макрофаге при деловању форбол 12-миристат 13-ацетата (PMA), што индукује акумулирање NF-κB у цитоплазми. Стимулација липополисахаридом (LPS) индукује транслокацију NF-κB у нуклеус праћену секрецијом TNF-α и активацијом COX-2 (*Слика 4.4.*).[293]



Слика 4.4. Шематски приказ NF-κB активације COX-2.
Преузето од Takashiba et al. (1999)[293]

Ланчана реакција полимеразе је метода која омогућава умножавање одређеног фрагмента ДНК у *in vitro* условима, а Real time PCR је метода која комбинује конвенционалну PCR амплификацију и флуориметрију. Користе се пробе обележене флуоресцентним бојама. За један крај двоструко обележених проба везана је боја која се означава као донор, а за други крај акцепторска боја. Када се донор осветли светлошћу диоде он емитује светлост коју апсорбује акцептор који емитује светлост веће таласне дужине. Флуоресцентне пробе су секвенционо-специфичне и садрже олигонуклеотид обележен репортерским молекулом (акцептор) на 5'-крају који емитује флуоресцентни сигнал, и „quencher" (донорска боја), на другом 3'-крају, који пригушује (супримира) флуоресцентни сигнал (Taq Man probe). Секвенце проба су дизајниране тако да хибридизују са амплификованим фрагментом ДНК у оријентацији глава-реп. Када пробе хибридизују у тој оријентацији, између две флуоресцентне боје је „пукотина" од неколико (1−5) нуклеотида. Повећање продуката PCR амплификације се прати анализом флуоресценције акцептора.[294]

4.8.2.1. Коришћене ћелијске линије

Ћелијска линија хумане акутне моноцитне леукемије THP-1 (European Collection of Cell Culture; ItemNo. 88081201) гајена на подлози RPMI 1640 (Gibco®, Њујорк, САД) обогаћеној са 2 mM L-глутамином, 10% топлотно-инактивираним феталним говеђим серумом (FBS, Gibco®, Њујорк, САД), 10 mM HEPES (N-2-хидроксиетилпиператин-N-2-етан сулфонска киселина, Gibco®, Њујорк, САД), 100 U/mL пеницилином и 100 μg/mL стрептомицином (Pen/strep, Gibco®, Њујорк, САД) на 37°C при оптималној влажности, у атмосфери засићеној са 5% CO_2.

За иницијацију стварања THP-1 моноцитних макрофага засејано је 1×10^6 ћелија у 20 удубљења на плочи у RPMI 1640 медијуму који садржи 12 nM PMA (форбол 12-миристат 13-ацетат, Sigma, MO, САД) у трајању од 48 h. Након диференцијације макрофага, ћелије су третиране са биљним екстрактима у концентрацији 25 μg/mL у трајању од 1 h и стимулисане са финалном концентрацијом LPS-а 7.5 ng/mL (липопо-

лисахарид, Sigma, MO, USA) додатна 3 h. Ћелије које су третиране са DMSO-ом (диметилсулфоксид ≤ 0.1%) коришћене су као узорци за калибрацију. Пре екстракције РНК (рибонуклеинске киселине) ћелије су испиране 3 пута са хладним PBS пуфером (*енг.* „phosphate buffered saline“, Gibco®, Њујорк, САД) како би се уклониле све незакачене ћелије.

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

Укупна РНК је екстрахована коришћењем комерцијално доступног сета (Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit - Sigma, MO, САД) и реверсна транскрипција на комплементарну ДНК (сДНК) вршена је коришћењем комерцијално доступног сета (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Њујорк, САД), према упутству за употребу. Температурни услови циклуса подешени су на 25ºC у току 25 min, 37ºC у току 120 min и 85ºC у току 5 s. Концентрација РНК коришћена за реверсну транскрипцију била је 1 μg за укупну запремину од 20 μL сДНК (~ 40 ng/μL сДНК).

4.8.2.3. Real-time PCR

Анализа експресије COX-2 гена изведена је на PCR-уређају ABI-7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Њујорк, САД) коришћењем комерцијално доступног сета Pre-developed Taq Man® Assay (Applied Biosystems, Њујорк, САД). 3 μL сДНК коришћено је за методу real time PCR (~ 110 ng cDNA). Циљана сДНК је амплификована коришћењем COX-2 прајмера: у правцу 5′-GAA-TCA-TTC-ACCAGG-CAA-ATT-G-3′, обрнуто 5′-TCT-GTA-CTG-CGG-GTG-GAA-CA-3′ и COX-2 пробе: FAM-5′-TCC-TAC-CAC-CAG-CAA-CCC-TGC-CA-3′-TAMRA (Applied Biosystems, Њујорк, САД). Услови циклуса су били следећи: 50ºC у току 2 min, 95ºC у току 10 min, праћени са 40 PCR циклуса на 95ºC у току 15 s и 60ºC у трајању од 1 min. Циљани гени су нормализовани на ниво глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназе (GAPDH) и релативно квантификовани коришћењем $2^{-(\Delta\Delta CT)}$методе.[292,295]

4.9. *In vivo* испитивање антиинфламаторне активности

4.9.1. Експерименталне животиње

У експериментима су коришћени албино пацови мушког пола из Wistar соја, масе од 250 ± 20 g. Животиње су добављене са животињске фарме Војномедицинске академије у Београду и чуване су у виваријуму на темпаратури 23 ± 1°C и релативној

влажности ваздуха 50 ± 15%, у току три дана ради аклиматизације на услове идентичне експерименталним. У току боравка смештани су у кавезе од плексигласа (42.5 cm × 27 cm × 19 cm), са жичаном решетком постављеном одозго. Као подлога у кавезима коришћена је стерилисана струготина од дрвета. У једном кавезу је смештано по 6-8 пацова.

Вода и храна (специјални брикети за храњење животиња, Ветзавод, Суботица, Србија), биле су им доступне у току читавог дана (24 h), осим у току трајања експеримента. Животиње су чуване у условима са природним циклусом дан/ноћ (12/12 h светлост–мрак режим). Експерименталне животиње су третиране по протоколима европске уније (86/609/EEC) и принципима добре лабораторијске праксе (GLP) одобреним од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, Србија.

4.9.2. Испитивање антиноцицептивне активности (тест вруће плоче)

Према дефиницији Међународног удружења за проучавање бола (*енг.* „International Association for the Study of Pain“ - IASP) бол се дефинише као: „непријатан осећај и емоционално искуство изазвано стварним или потенцијалним оштећењем ткива, или узроковано тим оштећењем или повредом“.[296] Према механизму настанка бол се класификује као ноцицептивни (соматски или висцерални) и неуропатски бол, а на основу трајања болног осећаја, бол може бити акутни и хронични.[297] Тест вруће плоче за испитивање антиноцицептивне активности спроведен је по методи коју су описали Melo *et al.* (2013)[298] коришћењем албино пацова соја Wistar. Топлотни стимуланс у овом тесту користи се за проучавање аналгетске активности посредоване централним механизмима.[299]

Животиње су подељене у 10 група при чему је свака група садржала по 6 пацова (n = 6). Експериментални протокол подразумевао је да једна група буде дефинисана као негативна контрола, друга група третирана је стандардним антиинфламаторним леком, а животиње из преосталих група су третиране растворима екстраката испитиваних биљака у две различите концентрације (*Табела 4.3.*).

Група I представљала је негативну односно нормалну контролну групу и није била третирана ниједним агенсом. Животиње из групе II су третиране *per os* (*p.o.*) стандардним антиинфламаторним леком индометацином (Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка) у дози 10 mg по килограму телесне масе. Групама III и IV апликован је екстракт надземног дела *F. ulmaria* (FUA) у концентрацијама 100 и 200 mg/kg. Групе V и VI добиле су екстракт корена *F. ulmaria* (FUR) у две дозе 100 и 200 mg/kg. На исти начин третиране су групе VII и VIII, са екстрактом надземног дела *F. hexapetala* (FHA) у истим дозама, а такође и групе IX и X са екстрактом корена *F. hexapetala* (FHR). Животињама су екстракти и индометацин аплицирани у току три дана и након апликације узорака спроведено је мерење антиноцицептивне активности.

Табела 4.3. Третмани експерименталних животиња за испитивање антиноцицептивне активности

Група	*Третман*	*Доза*
I	Негативна контрола* – физиолошки раствор	10 mL/kg, *p.o.*
II	Стандардни лек – индометацин	10 mg/kg, *p.o.*
III	*F. ulmaria* надземни део – FUA	100 mg/kg, *p.o.*
IV	*F. ulmaria* надземни део – FUA	200 mg/kg *p.o.*
V	*F. ulmaria* корен – FUR	100 mg/kg, *p.o.*
VI	*F. ulmaria* корен – FUR	200 mg/kg, *p.o.*
VII	*F. hexapetala* надземни део – FHA	100 mg/kg, *p.o.*
VIII	*F. hexapetala* надземни део – FHA	200 mg/kg *p.o.*
IX	*F. hexapetala* корен – FHR	100 mg/kg, *p.o.*
X	*F. hexapetala* корен – FHR	200 mg/kg, *p.o.*

*У случају испитивања антиедематозне активности група I је позитивна контрола.

Животиње се једна по једна стављају на аналгезиометар чија се температура одржава на at 51.5 ± 0.5°C и прати се њихово понашање. Испитивани параметар је време које је животиња провела на врућој плочи (аналгезиометру) све до тренутка када лизне или подигне задњу шапу, што указује да осећа бол. Како би се избегло оштећење шапа услед изложености повишеној температури, максимално време боравка животиња на врућој плочи ограничено је на 180 s.[300]

Резултати су изражени као проценат инхибиције осећаја бола (аналгезије) у односу на негативну контролну групу, а израчунавају се помоћу обрасца (11):

$$\% \text{ инхибиције} = \frac{a-b}{b} \times 100 \qquad (11)$$

Где је: a – време проведено на врућој плочи (третирана група); b – време проведено на врућој плочи (контролна група).

4.9.3. Испитивање антиедематозне активности (карагенан-индукована акутна инфламација)

Експерименталне животиње подељене су у 10 група при чему је свака група садржала 8 животиња. Као референтни антиинфламаторни лек коришћен је индометацин (Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка). Екстракти и индометацин су пре експеримента растворени у физиолошком раствору. Третман експерименталних животиња по групама је идентичан третману код испитивања антиноцицептивне активности (*Табела 4.3.*).

I група (у *Табели 4.3.* означена као негативна контрола) – животиње нису третиране антиинфламаторним агенсом већ су само добијале физиолошки раствор (10

mL/kg, *p.o.*). II група – животиње су примале стандардни антиинфламаторни лек индометацин (10 mg/kg, *p.o.*). Групе III и IV добијале су FUA екстракт у две различите дозе 100 и 200 mg/kg, *p.o.*; групе V и VI добијале су FUR екстракт (100 и 200 mg/kg, *p.o.*), групе VII и VIII добијале су FHA екстракт (100 и 200 mg/kg, *p.o.*) и групе IX и X су третиране екстрактом FHR у наведеним дозама. Експерименталним животињама раствори екстраката испитиваних биљака и индометацин су давани три узастопна дана пре изазивања инфламације.[301] Локални акутни инфламаторни одговор код свих група животиња изазван је интраплантарном апликацијом (*i.p.*) 0.1 mL раствора карагенана (1% w/v; Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка) у задњу десну шапу пацова.[302] Треба нагласити да је у овом случају испитивања антиедематозне активности група I дефинисана као позитивна контрола, где је инфламација изазвана карагенаном најинтензивнија јер није коришћен ниједан антиинфламаторни агенс.

Повећање едема третиране шапе пацова мерено је у оквирима унапред дефинисаног временског интервала. Запремина третиране шапе мерена је пре инјектирања карагегана (0 h), потом на свака 2 h све до шестог сата, и на крају на 24 h након изазивања инфламације.

Проценат инхибиције инфламаторног одговора изражен је преко вредности за проценат повећања едема шапе, при чему је свака животиња била контрола самој себи што представља вредност запремине шапе на нултом времену, преко следеће формуле (12):

$$\%\ \text{повећање едема шапе} = \frac{a-b}{b} \times 100 \qquad (12)$$

Где је a – запремина шапе у различитим временским интервалима након апликације карагенана (2 h, 4 h, 6 h и 24 h); b – запремина шапе на нултом времену пре инјектирања карагенана (0 h).

4.10. *In vivo* испитивање нефропротективне и хепатопротективне активности екстраката код стања токсичности изазваног цисплатином

4.10.1. Експерименталне животиње

За испитивање нефро- и хепатопротективне активности екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* коришћени су албино лабораторијски пацови из соја Wistar, старости 2 месеца и телесне масе 230 ± 20 g који су добијени са животињске фарме Војномедицинске академије, Београд, Србија. Експерименталне животиње су подвргнуте процесу аклиматизације на лабораторијске услове (температура 24 ± 2°C, релативна влажност ваздуха 50 ± 15%, циклус 12 h светлост/12 h мрак), са слободним приступом храни и води. Сви експерименти са животињама спроведени су по протоколима одобреним од стране Етичког комитета за рад са експерименталним животињама, Института за биолошка истраживања у Београду и у складу су са дире-

ктивама Савета Европе (86/609/EEC) о заштити животиња коришћених у експерименталне и друге научне сврхе.

4.10.2. Нефро- и хепатопротективна активност – дизајн експеримента

Експерименталне животиње су најпре измерене ради утврђивања телесне масе, а затим су произвољно подељене у 20 група, при чему је свака група садржала по 5 пацова (n = 5). Сви испитивани екстракти (FUA, FUR, FHA и FHR) растворени су у физиолошком раствору и животиње су, у току 10 дана, свакога дана орално (*p.o.*) добијале дозу екстракта унапред дефинисане концентрације. Базирано на претходним испитивањима које су спровели Sahu *et al.* (2011, 2013)[303,304], нефро- и хепатотоксичност индукована је петог дана третмана интраперитонеалном (*i.p.*) апликацијом цисплатине (CP, Sigma-Aldrich, Steinheim, Немачка) растворене у физиолошком раствору, у дози 7.5 mg по килограму телесне масе (т.м.) животиња. Сам поступак третирања животиња унапред је дефинисан на начин приказан у *Табели 4.4.*

Група I је означена као негативна (нормална) контрола и животиње из ове групе једном дневно су орално добијале дозу физиолошког раствора у току 10 дана, при чему је петог дана животињама инјектирано 0.5 mL изотоничног физиолошког раствора. Група II служила је као позитивна (цисплатина) контрола где су животиње, као и у претходној групи, добијале физиолошки раствор у току 10 дана, са разликом што су 5. дана добијале интраперитонеалну инјекцију цисплатине (7.5 mg/kg т.м., *i.p.*) растворене у физиолошком раствору. При испитивању екстраката *F. ulmaria*, животиње у групама III–V добијале су FUA екстракт у три различите дозе (100, 200 и 400 mg/kg т.м. по дану, *p.o.*) у току 10 дана. Код животиња у овим групама токсичност је изазвана аплицирањем цисплатине 5. дана третмана (7.5 mg/kg т.м., *i.p.*). Групе VI–VIII третиране су 10 дана FUR екстрактом, на исти начин као што је претходно објашњено (100, 200 и 400 mg/kg т.м. по дану, *p.o.*). Свим животињама у групама које су третиране екстрактима петог дана третмана изазвана је токсичност аплицирањем једне дозе цисплатине (7.5 mg/kg т.м., *i.p.*). Групе IX и X служиле су као контролне групе за највећу дозу екстраката, тако да су животиње из групе IX добијале орално FUA екстракт у дози 400 mg/kg т.м. по дану, у току 10 дана. Сходно томе је и група X добијала FUR екстракт у дози 400 mg/kg т.м. по дану, у току 10 дана. У експерименту са екстрактима *F. hexapetala* (*Табела 4.4.*) такође су постојале негативна и позитивна контролна група (групе I и II), док су групе животиња III-V добијале FHA екстракт, а групама VI-VIII аплициран је FHR екстракт у дозама које су претходно већ утврђене (100, 200 и 400 mg/kg т.м. по дану, *p.o.*). И у овом случају групе IX и X биле су контроле за највећу дозу екстраката. Група IX добијала је FHA и група X добијала је FHR екстракт у највећој дози 400 mg/kg т.м. по дану, у току 10 дана.

24 h након последњег третмана измерена је телесна маса свих животиња, потом су животиње анестезиране етром и жртвоване декапитацијом, а крв сваке животиње је одмах узоркована. Након тога, извађени су органи животиња (јетра и бубрези) и

измерена је маса сваког органа како би се могао одредити однос тежине органа и телесне масе животиње. Делови ткива органа који ће се касније користити за биохемијске анализе, испитивање оксидативног стреса и одређивање генотоксичности екстраката су замрзнути. Узорци ткива одвојени за хистопатолошку анализу су одмах фиксирани у 4% формалину.

Табела 4.4. Третмани експерименталних животиња за испитивање нефро- и хепато-протективне активности екстраката F. ulmaria (FUA и FUR) и F. hexapetala (FHA и FHR)

Испитивање активности екстраката F. ulmaria			
Група[а]	*Третман (10 дана)*	*Доза*[б]	*Изазивање токсичности (5. дана)*[в]
I	Физиолошки раствор	10 mL/kg, *p.o.*	/
II	Физиолошки раствор	10 mL/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
III	FUA	100 mg/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
IV	FUA	200 mg/kg *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
V	FUA	400 mg/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
VI	FUR	100 mg/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
VII	FUR	200 mg/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
VIII	FUR	400 mg/kg *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
IX	FUA	400 mg/kg *p.o.*	/
X	FUR	400 mg/kg *p.o.*	/
Испитивање активности екстраката F. hexapetala			
Група	*Третман (10 дана)*	*Доза*	*Изазивање токсичности (5. дана)*
I	Физиолошки раствор	10 mL/kg, *p.o.*	/
II	Физиолошки раствор	10 mL/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
III	FHA	100 mg/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
IV	FHA	200 mg/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
V	FHA	400 mg/kg *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
VI	FHR	100 mg/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
VII	FHR	200 mg/kg, *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
VIII	FHR	400 mg/kg *p.o.*	CP 7.5 mg/kg, *i.p.*
IX	FHA	400 mg/kg *p.o.*	/
X	FHR	400 mg/kg *p.o.*	/

[а] – $n = 5$; [б] – орална примена (*lat. per os*); [в] – интраперитонеална апликација (*i.p.*); CP – цисплатина.

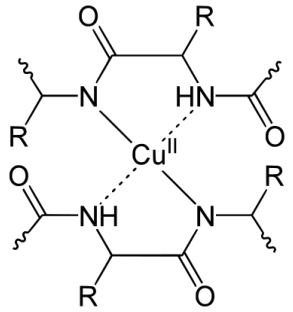
4.10.3. Одређивање биохемијских маркера у серуму

Како би се добио серум за анализирање биохемијских параметара, узорци крви експерименталних животиња су сакупљени у стерилне стаклене кивете и остављени 45 min на собној температури како би дошло до згрушавања крви. Затим су узорци центрифугирани на 3000 × *g* коришћењем Sorval SS-34 rotor центрифуге (DJB Labace Ltd., Newport Pagnell, Buckinghamshire, Велика Британија) у трајању од 10 min на 4°C како би се одвојио серум. Узорци серума су замрзнути и тако чувани до тренутка њиховог анализирања.

Биохемијски маркери у серуму који указују на ренална и хепатичка оштећења, као што су укупни протеини, уреа, креатинин, мокраћна киселина, ALT, AST, ALP и γ-GT одређивани су помоћу комерцијално доступних дијагностичких сетова – ELI Tech реагнеси (ELI Tech Clinical Systems, Sees, Француска) на UV–VIS double beam спектрофотометру Halo DB-20S (Dynamica GmbH, Швајцарска) или BioSystems реагенси (BioSystems S.A., Barcelona, Шпанија) на Roche/Cobas Mira аутоматском анализатору (Roche Diagnostic Limited, Rotkreuz, Швајцарска). Сви параметри су одређивани према клиничким протоколима Интернационалне федерације за клиничку хемију (*енг.* „International Federation of Clinical Chemistry" – IFCC).

4.10.3.1. Одређивање количине укупних протеина

Укупни протеини (TP) у серуму експерименталних животиња одређивани су биуретском методом која је заснована на реакцији комплексирања Cu^{2+} јона са атомима азота из пептидних веза протеина у базној средини, при чему настаје комплекс љубичасте боје (*Слика 4.5.*).[305] Интензитет боје се може мерити спектрофотометријски. За одређивање укупних протеина коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (ELI Tech Clinical Systems, Sees, Француска).



Слика 4.5. Комплекс Cu^{2+} јона са атомима азота из пептидних веза протеина

Реагенси:

1. Реагенс R – састоји се од калијум јодида (KI, 6 mmol/L), калијум натријум тартарата ($KNaC_4H_4O_6$, 21 mmol/L), бакар сулфата ($CuSO_4$, 6 mmol/L), натријум хидроксида (NaOH, 490 mmol/L);

2. Стандард – албумин (60 g/L);
3. Узорак – серуми.

Поступак:

Припремају се бланко и калибрациона кивета, као и кивете за тестирање (са узорцима) по следећој процедури: у бланко кивету додаје се 300 µL реагенса R и 3 µL дестиловане воде, у калибрациону кивету се такође додаје 300 µL реагенса R, али се уместо воде додаје иста запремина стандарда. Кивете са узорцима садрже 3 µL узорка и 300 µL реагенса R. Након припреме, смеша се инкубира 11 min 30s на 37°C и мери се апсорбанца на 546 nm. Интензитет љубичастог обојења сразмеран је концентрацији протеина у серуму. Концентрација протеина у узорку израчунава се по следећој формули (13):

$$c\ \text{узорка} = \frac{\text{А узорка}}{\text{А стандарда}} \times c\ \text{стандарда} \qquad (13)$$

4.10.3.2. Одређивање активности аланин трансаминазе (ALT)

Аланин трансаминаза (ALT) EC 2.6.1.2., позната још и као аланин аминотрансфераза или глутамат пируват трансаминаза (GPT), је ензим који припада групи трансаминаза и катализује пренос амино групе L-аланина на α-кетоглутарат при чему настаје L-глутамат и пируват (*Схема 4.8.*).[200]

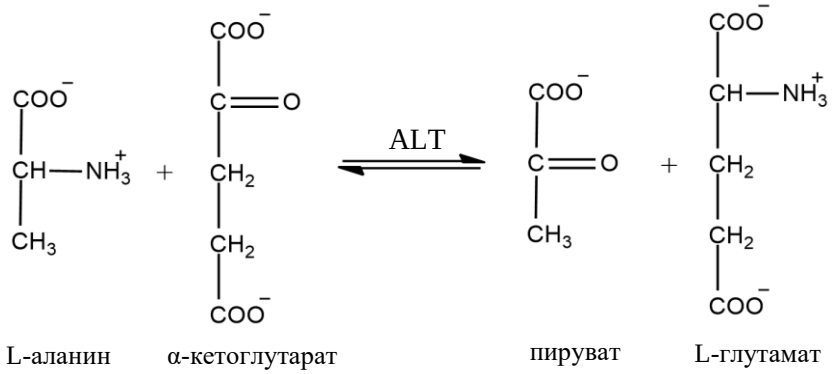


Схема 4.8. Реакција трансаминације аланина катализована аланин трансаминазом (ALT)

Највећу активност ензим испољава у јетри и бубрезима, а мање количине ALT су присутне у срцу и скелетним мишићима. За одређивање активности ALT коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (ELI Tech Clinical Systems, Sees, Француска). Принцип методе је заснован на праћењу смањења концентрације коензима NADH на 340 nm, посредством спрегнуте реакције коју катализује лактат дехидрогеназа (LDH), при чему од пирувата настаје L-лактат (*Схема 4.9.*).

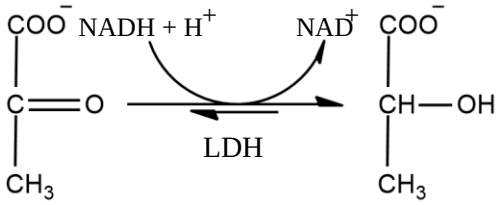


Схема 4.9. Реакција настајања лактата из пирувата катализована лактат дехидрогеназом (LDH)

Реагенси:

1. Реагенс R1 – састоји се од TRIS пуфера (pH 7.5, 30°C, 125 mmol/L), L-аланина (680 mmol/L) и лактат дехидрогеназе (LDH, ≥ 2000 U/L);
2. Реагенс R2 – састоји се од α-кетоглутарата (97 mmol/L) и коензима NADH (1.1 mmol/L);
3. Узорак – серуми.

Поступак:

Температура уређаја се подеси на 37°C, у кивете се дода 200 µL реагенса R1 и 50 µL реагенса R2 и сачека се 25s. Потом се дода 25 µL узорка. Смеша се добро промеша и након 50 s инкубације мери се промена апросбанце по минуту (ΔA/min) у току 150 s на таласној дужини 340 nm. Активност ензима израчунава се помоћу формуле (14):

$$ALT\ (U/L) = \Delta A/\min \times 1746 \qquad (14)$$

4.10.3.3. Одређивање активности аспартат трансаминазе (AST)

Аспартат трансаминаза (AST) EC 2.6.1.1., позната још и као аспартат аминотрансфераза или глутамат оксалацетат трансаминаза (GOT), је ензим који припада групи трансаминаза и катализује пренос амино групе са L-аспартата на α-кетоглутарат, при чему настаје L-глутамат и оксалацетат (*Схема 4.10.*).[200]

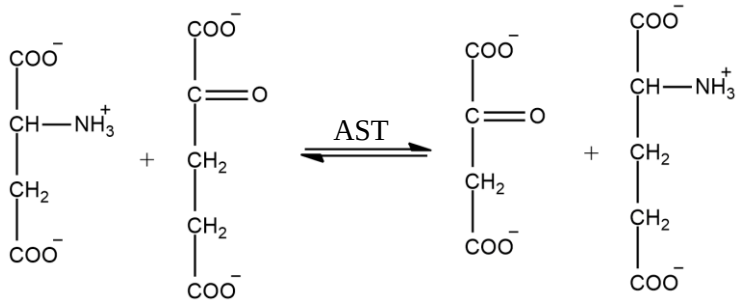


Схема 4.10. Реакција трансаминације аспарагинске киселине катализована аспартат трансаминазом (AST)

AST је присутан у срцу, бубрезима, јетри и скелетним мишићима. За одређивање активности AST коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (ELI Tech Clinical Systems, Sees, Француска). Принцип методе је заснован на праћењу смањења концентрације коензима NADH на 340 nm, посредством спрегнуте реакције коју катализује малат дехидрогеназа (MDH), при чему из оксалацетата настаје L-малат (*Схема 4.11.*).

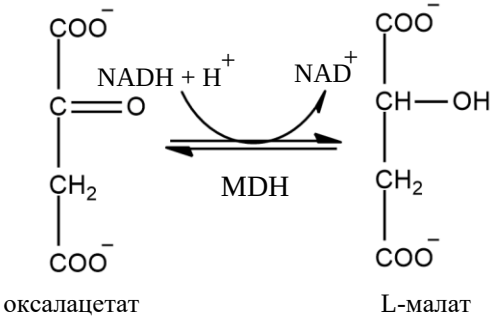


Схема 4.11. Реакција настајања малата из оксалацетата катализована малат дехидрогеназом (MDH)

Реагенси:

1. Реагенс R1 – састоји се од TRIS пуфера (pH 7.8, 30°C, 100 mmol/L), L-аспартата (330 mmol/L), лактат дехидрогеназе (LDH, ≥ 2000 U/L) и малат дехидрогеназе (MDH, ≥ 1000 U/L);
2. Реагенс R2 – састоји се од α-кетоглутарата (78 mmol/L) и коензима NADH (1.1 mmol/L);
3. Узорак – серуми.

Поступак:

Температура уређаја се подеси на 37°C, у кивете се дода 200 µL реагенса R1 и 50 µL реагенса R2 и сачека се 25 s. Потом се дода 25 µL узорка. Смеша се добро промеша и након 50 s инкубације мери се промена апросбанце по минуту (ΔA/min) у току 150 s на таласној дужини 340 nm.

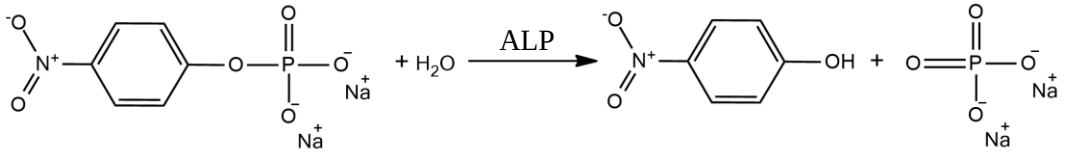
Активност ензима израчунава се помоћу формуле (15):

$$AST\ (U/L) = \Delta A/\min \times 1746 \qquad (15)$$

4.10.3.4. Одређивање активности алкалне фосфатазе (ALP)

Алкална фосфатаза (ALP) EC 3.1.3.1., је ензим који припада групи хидролаза и катализује реакцију преноса фосфатне групе са различитих биомолекула, укључујући нуклеотиде, протеине и алкалоиде, у базној средини.[200] За одређивање активности ALP коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (ELI Tech Clinical Systems, Sees, Француска). Метода се заснива на кинетичком одређивању активности ALP у реакцији

преноса фосфатне групе са *p*-нитрофенилфосфата на 2-амино-2-метил-1-пропанол (AMP), при чему настаје *p*-нитрофенол, једињење жуте боје (*Схема 4.12.*). Повећање концентрације *p*-нитрофенола прати се мерењем апсорбанце на 405 nm.



p-нитрофенилфосфат *p*-нитрофенол

Схема 4.12. Реакција настајања p-нитрофенола из p-нитрофенилфосфата катализована алкалном фосфатазом (ALP)

Реагенси:

1. Реагенс R1 – састоји се од диетаноламин пуфера (pH 10.2, 30°C, 1.25 mol/L) и магнезијум хлорида ($MgCl_2$, 0.625 mmol/L);
2. Реагенс R2 – *p*-нитрофенилфосфат (50 mmol/L);
3. Узорак – серуми.

Поступак:

Температура уређаја се подеси на 37°C, у кивете се дода 250 µL реагенса R1 и 60 µL реагенса R2, промеша се и сачека се 25 s. Потом се дода 5 µL узорка. Смеша се добро промеша и након 50 s инкубације мери се промена апросбанце по минуту (ΔA/min) у току 75 s на таласној дужини 405 nm. Активност ензима израчунава се помоћу формуле (16):

$$ALP\ (U/L) = \Delta A/\min \times 3397 \qquad (16)$$

4.10.3.5. Одређивање активности гама-глутамил трансферазе (γ-GT)

Гама-глутамил трансфераза (γ-GT) EC 2.3.2.2, позната још и као гама-глутамил транспептидаза (GGTP), је ензим који припада групи пептидаза и катализује пренос гама-глутамил функционалне групе глутатиона на акцептор који може бити аминокиселина, пептид или вода, при чему настаје глутамат. Налази се у већини ткива, а највише је присутна у јетри. γ-GT има значајну улогу у метаболизму глутатиона и учествује у транспорту аминокиселина у ћелије. Пораст γ-GT је један од најосетљивијих показатеља обољења јетре или билијарног тракта.[200] За одређивање активности γ-GT коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (ELI Tech Clinical Systems, Sees, Француска). Метода се заснива на кинетичком одређивању активности γ-GT у реакцији преноса гама-глутамил функционалне групе са L-γ-глутамил-3 карбокси-*p*-нитроанилид моноамонијум соли на дипептид глицилглицин при чему настаје L-γ-глутамил-глицилглицин и 5-амино-2-нитробензоева киселина (*Схема 4.13.*). Пораст

апсорбанце на 405 nm услед формирања 5-амино-2-нитробензоеве киселине је пропорционалан активности γ-GT.

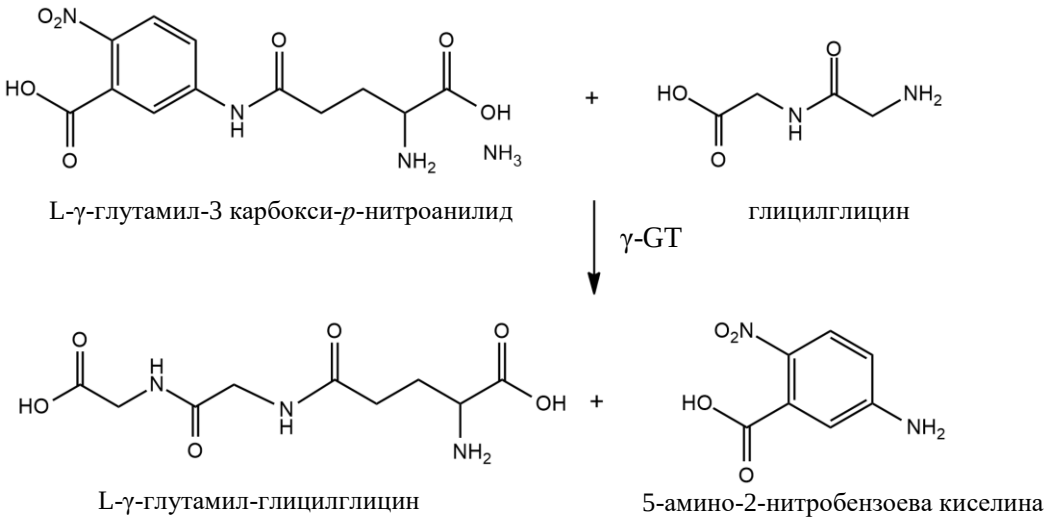


Схема 4.13. Реакција настајања 5-амино-2-нитробензоеве киселине из L-γ-глутамил-3 карбокси-p-нитроанилида катализована гама-глутамил трансферазом(γ-GT)

Реагенси:

1. Реагенс R1 – састоји се од TRIS пуфера (pH 8.25, 30°C, 133 mmol/L) и глицилглицина (138 mmol/L);
2. Реагенс R2 – L-γ-глутамил-3 карбокси-*p*-нитроанилидмоноамонијум со (GLUPA-C, 23 mmol/L);
3. Узорак – серуми.

Поступак:

Температура уређаја се подеси на 37°C, у кивете се дода 200 μL реагенса R1 и 50 μL реагенса R2, промеша се и сачека се 25 s. Потом се дода 12.5 μL узорка. Смеша се добро промеша и након 50 s инкубације мери се промена апросбанце по минуту (ΔA/min) у току 3 min на таласној дужини 405 nm. Активност ензима израчунава се помоћу формуле (17):

$$\gamma - \mathrm{GT}\ (\mathrm{U/L}) = \Delta \mathrm{A}/\min \times 2211 \qquad (17)$$

4.10.3.6. Одређивање концентрације урее

Вишак азота се из организма излучује, пре свега, у облику урее. Уреа је једно од најједноставнијих органских једињења које формира CO_2, амонијум јон и/или амино група аспартата у циклусу урее. Синтеза урее обезбеђује механизам за детоксикацију организма од амонијака насталог у метаболичким процесима.[306] За одређивање количи-

не урее у серуму коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (BioSystems S.A., Barcelona, Шпанија). Метода се заснива на специфичној активности ензима уреазе који катализује разградњу молекула урее на амонијак и угљен диоксид. Затим амонијак реагује са α-кетоглутаратом, у присуству глутамат дехидрогеназе (GLDH) и коензима NADH, при чему настаје L-глутамат и оксидовани NAD^+ (*Схема 4.14.*). Смањење концентрације NADH се прати спектрофотометријски на 340 nm. За одређивање урее коришћен је Roche/Cobas Mira аутоматски анализатор.

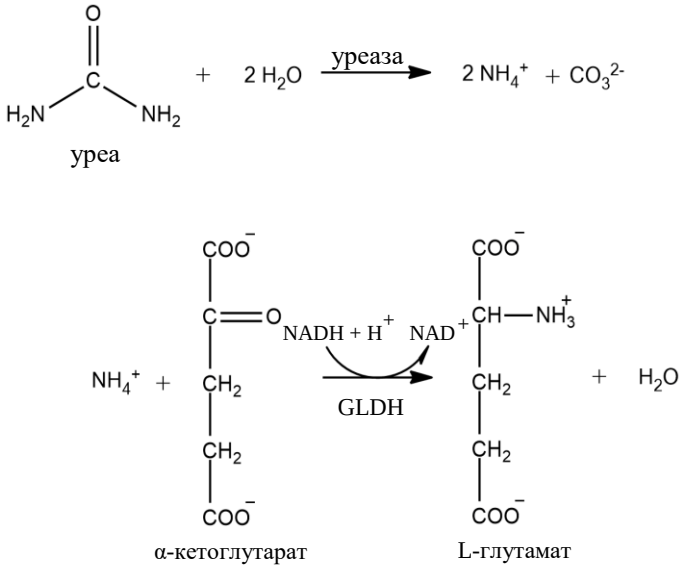


Схема 4.14. Спрегнуте реакције за одређивање концентрације урее

Реагенси:

1. Реагенс А – садржи TRIS пуфер (100 mmol/L), α-кетоглутарат (5.6 mmol/L), уреазу (> 140 U/mL), глутамат дехидрогеназу (> 140 U/mL), етиленгликол (220 g/L) и натријум азид (0.95 g/L, pH 8.0);
2. Реагенс В – садржи NADH (1.5 mmol/L) и натријум азид (9.5 g/L);
3. Стандард S – садржи глукозу (100 mg/dL), урею (50 mg/dL, 8.3 mmol/L, BUN 23.3 mg/dL) и креатинин (2 mg/dL);
4. Узорак – серуми.

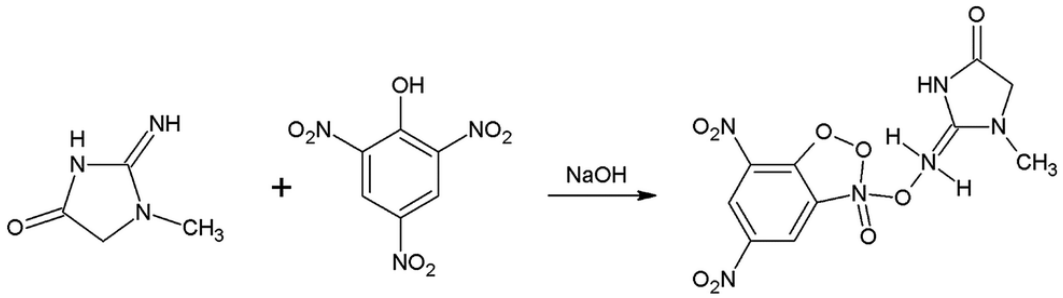
Поступак:

Направи се радни реагенс тако што се помеша реагенс А и реагенс В у односу 4:1. Температура уређаја се подеси на 37°C, у кивете се пипетира 1.5 mL радног реагенса и дода се 10 µL стандарда или иста запремина узорка, промеша се и мери се апсорбанца на 30 s (A1) и 90 s (A2) на таласној дужини 340 nm. Концентрација урее у серуму израчунава се помоћу формуле (18):

$$\text{урea (mmol/L)} = \frac{(\text{A1}-\text{A2})\ \text{узорка}}{(\text{A1}-\text{A2})\ \text{стандарда}} \times 8.3 \qquad (18)$$

4.10.3.7. Одређивање концентрације креатинина

Креатинин настаје у мишићима иреверзибилном неензимском дехидратацијом и дефосфатацијом креатин фосфата. Аминокиселине глицин, аргинин и метионин учествују у биосинтези креатинина. Ниво креатинина у серуму је важан индикатор нормалне функције бубрега, јер је као продукт мишићног метаболизма у бубрезима непромењен и такав се излучује из организма.[200] За одређивање количине креатинина у серуму коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (BioSystems S.A., Barcelona, Шпанија) базиран на Jaffé методи. Ова метода се заснива на реакцији креатинина са пикратом у базној средини, при чему настаје црвено обојени комплекс (Јановски комплекс) чија се апсорбанца може пратити на 520 nm (*Схема 4.15.*). За одређивање креатинина коришћен је Roche/Cobas Mira аутоматски анализатор.



креатинин пикринска киселина Јановски комплекс

Схема 4.15. Реакција креатинина и пикринске киселине у базној средини, при чему настаје Јановски комплекс

Узорци серума и плазме садрже и неке протеине који могу неспецифично реаговати са реагенсом, тако да резултат може бити коригован одузимањем дефинисане вредности.

Реагенси:

1. Реагенс А – садржи натријум хидроксид (NaOH, 0.4 mol/L) и детерџент;
2. Реагенс В – садржи пикринску киселину (25 mmol/L);
3. Стандард S – садржи глукозу (100 mg/dL), уреу (50 mg/dL) и креатинин (2 mg/dL, 177 μmol/L);
4. Узорак – серуми.

Поступак:

Направи се радни реагенс тако што се помеша реагенс А и реагенс В у односу 1:1. Овај реагенс је стабилан 1 месец на температури 2−8°C. Температура уређаја се подеси на 37°C, у кивете се пипетира 1 mL радног реагенса и дода се 0.1 mL стандарда или иста запремина узорка, промеша се и мери се апсорбанца након 30 s (A1) и 90 s (A2) на

таласној дужини 520 nm. Концентрација креатинина у серуму израчунава се помоћу формуле (19):

$$\text{креатинин}\ (\mu\text{mol/L}) = \left(\frac{(\text{A1}-\text{A2})\ \text{узорка}}{(\text{A1}-\text{A2})\ \text{стандарда}} \times 177\right) - 33 \qquad (19)$$

4.10.3.8. Одређивање концентрације мокраћне киселине

Мокраћна киселина представља крајњи производ метаболизма пуринских нуклеотида у хуманом огранизму. То је релативно нерастворљиво једињење које се синтетише у јетри и цревима и излучује урином. Одређивање овог параметра у серуму или плазми је од изузетног значаја за утврђивање функције бубрега.[306] За одређивање количине мокраћне киселине у серуму коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (BioSystems S.A., Barcelona, Шпанија). Метода се заснива на реакцији катализованој ензимом уриказа, при чему из мокраћне киселине настаје алантоин и ослобађа се водоник пероксид. Водоник пероксид учествује у реакцији дихлорофенолсулфоната (DCFS) са 4-аминоантипирином, која је катализована пероксидазом, и у којој настаје црвено обојени хинонимин комплекс (*Схема 4.16.*). Апсорбанца овог комплекса може се пратити на 520 nm. За одређивање урее коришћен је Roche/Cobas Mira аутоматски анализатор.

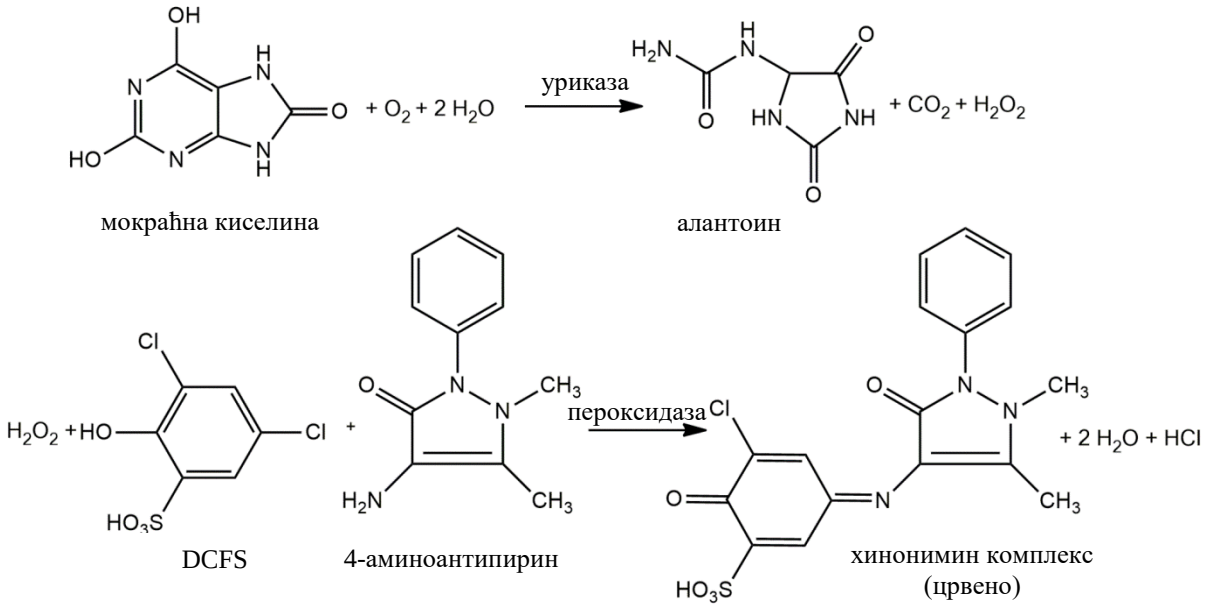


Схема 4.16. Спрегнуте реакције за одређивање концентрације мокраћне киселине

Реагенси:

1. Реагенс А – садржи фосфат (100 mmol/L), детерџент (1.5 g/L), дихлорофенолсулфонат (DCFS, 4 mmol/L), уриказу (> 0.12 U/mL), аскорбат оксидазу (> 5 U/mL), пероксидазу (> 1 U/mL) и 4-аминоантипурин (pH 7.8, 0.5 mmol/L);

2. Стандард S – садржи мокраћну киселину (6 mg/dL, 357 μmol/L);
3. Узорак – серуми.

Поступак:

Температура уређаја се подеси на 37°C, у кивете се пипетира 1 mL реагенса и дода се 25 μL стандарда, иста запремина узорка или дестиловане воде (за бланко пробу). Смеша се добро промеша и инкубира се 5 min на 37°C. Након инкубације мери се апсорбанца стандарда и узорака на таласној дужини 520 nm у односу на бланко пробу. Боја је стабилна најмање 30 min. Концентрација мокраћне киселине у серуму израчунава се помоћу формуле (20):

$$\text{мокраћна киселина } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{А узорка}}{\text{А стандарда}} \times 357 \qquad (20)$$

4.10.4. Одређивање маркера оксидативног стреса у хомогенатима ткива бубрега и јетре

Хомогенати ткива бубрега и јетре (10%) припремљени су коришћењем фосфатног – PBS пуфера (*енг.* „phosphate buffer saline“, 50 mM, pH 7.4). Делови ткива су хомогенизовани у порцеланском авану са одговарајућом количином пуфера, у односу 1:10 (w/v). Добијени хомогенати су потом центрифугирани 15 min на 2000 × g на 4°C.[221] Супернатанти добијени након центрифугирања су одвојени, замрзнути и коришћени за одређивање антиоксидативних маркера у испитиваним органима. Параметри као што су активност ензима каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD), као и концентрација редукованог глутатиона (GSH) и тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци (TBARS) одређивани су спектрофотометријским методама на двозрачном UV–VIS спектрофотометру Halo DB-20S (Dynamica GmbH, Швајцарска)

4.10.4.1. Одређивање количине укупних протеина

За одређивање количине укупних протеина у хомогенатима бубрега и јетре коришћен је комерцијално доступан дијагностички сет (Human, Wiesbaden, Немачка). Метода се заснива на настајању љубичастог комплекса биуретског типа са Cu^{2+} јонима. Апсорбанца комплекса на 546 nm је пропорционална концентрацији протеина у узорку.

Реагенси:

1. Реагенс – садржи натријум хидроксид (NaOH, 200 mmol/L), Na,K-тартарат (32 mmol/L), бакар сулфат ($CuSO_4$, 12 mmol/L) и калијум јодид (KI, 30 mmol/L);
2. Стандард – албумин (80 g/L);
3. Узорак – хомогенати ткива.

Поступак:

Припремају се кивете са узорцима, стандардом и бланко пробом. У све кивете се дода 1 mL реагенса, потом се дода 20 μL узорка, односно стандарда, а у бланко пробу се дода 20 μL дестиловане воде. Смеша се добро промеша и инкубира 10 min на 20-25°C. Након инкубације мери се апсорбанца стандарда и узорака на таласној дужини 546 nm у односу на бланко пробу. Боја је стабилна најмање 30 min. Концентрација протеина у хомогенатима ткива израчунава се помоћу формуле (21):

$$\text{протеини (g/L)} = \frac{\text{А узорка}}{\text{А стандарда}} \times 80 \qquad (21)$$

4.10.4.2. Одређивање активности каталазе (CAT)

Каталаза (CAT) EC 1.11.1.6, позната још и као водоник пероксид оксидоредуктаза, је ензим који припада великој групи протеина који садрже хем простетичну групу. Овај ензим заступљен је у пероксизомима аеробних ћелија и катализује дисмутацију водоник пероксида (H_2O_2) на воду (H_2O) и кисеоник (O_2), чиме штити ове ћелије од реактивних кисеоничних интермедијера из аеробног метаболизма. Каталаза се налази у свим ткивима сисара, а највише је заступљена у јетри и бубрезима.[200]

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\,H_2O + O_2$$

Активност каталазе мерена је на основу њене способности да разгради водоник пероксид. Коришћена је метода коју је описао Góth (1991).[307]

Реагенси:

1. Водоник пероксид (H_2O_2,65 μM у PBS пуферу);
2. Амонијум молибдат ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$, 32.4 mM);
3. Узорак – хомогенати ткива.

Поступак:

При одређивању активности каталазе, 0.2 mL узорка инкубира се уз додатак 1 mL супстрата (H_2O_2) на 37°C у трајању од 60 s. Активност каталазе у узорку је линеарна све до 100 kU/L. Једна јединица CAT под оваквим условима разлаже 1 μM H_2O_2/L min. Ензимска реакција се зауставља додатком 1 mL раствора амонијум молибдата и апсорбанца насталог жутог комплекса молибдата и водоник пероксида мери се на 405 nm у односу на слепу пробу.

Каталитичка активност каталазе израчунава се из количине неизреаговалог водоник перксида, чија концентрација се добија очитавањем са стандардне праве. Стандардна права зависности апсорбанце од концентрације водоник пероксида се добија очитавањем апсорбанци узорака различитих концентрација водоник пероксида (5 – 65

μmol/mL H_2O_2) у реакцији са амонијум молибдатом на 405 nm. Каталитичка активност CAT изражена у U/L хомегената добија се из формуле (22):

$$\text{CAT (U/L)} = (65 - C_{H_2O_2}) \times \frac{V_{ук}}{V_{уз}} \times 1000 \qquad (22)$$

где је: $C_{H_2O_2}$, концентрација H_2O_2 очитана са стандардне праве (μmol/mL); $V_{ук}$, укупна запремина (2.2 mL); $V_{уз}$, запремина узорка (0.2 mL).

Каталитичка активност CAT изражена у интернационалним јединицама (U) по милиграму (mg) протеина у хомогенату добија се из формуле (23):

$$\text{CAT (U/mg протеина)} = \frac{\text{CAT U/L}}{C_{\text{протеина}}\ \text{mg/L}} \qquad (23)$$

где је: CAT (U/L), каталитичка активност CAT изражена у интернационалним јединицама (U) по 1 L хомогената; $C_{\text{протеина}}$ mg/L, концентрација протеина изражена у милиграмима по 1 L хомогената.

4.10.4.3. Одређивање активности супероксид дисмутазе (SOD)

Супероксид дисмутаза (SOD) EC 1.15.1.1, позната још и као супероксид оксидоредуктаза, је мултиензимски систем који постоји код свих аеробних организама. Катализује реакцију диспропорционисања супероксидног анјон-радикала у кисеоник и водоник пероксид. Веома је значајна у антиоксидативној заштити у скоро свим ћелијама које су изложене кисеонику.[155]

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

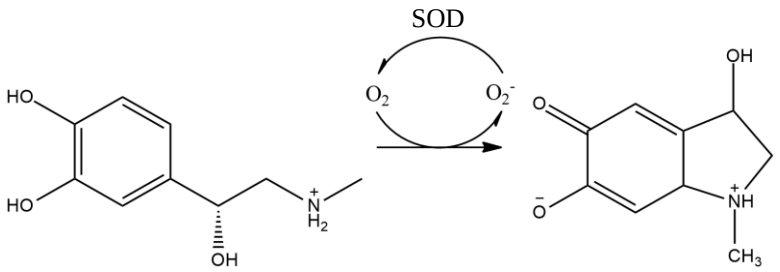
SOD-катализована редукција супероксидног анјон-радикала дешава се према следећим полуреакцијама:

$M^{(n+1)+}$-SOD + O_2^- → Mn^+-SOD + O_2
Mn^+-SOD + O_2^- + $2H^+$ → $M^{(n+1)+}$-SOD + H_2O_2.
Где је: M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2) ; Ni (n=2).
У овој реакцији оксидационо стање катјона метала се мења од n до n+1.

Идентификоване су 4 класе супероксид дисмутаза, које садрже јоне Cu, Zn, Fe или Mn као коензиме. Одређивање активности овог ензима у плазми и хомогенатима ткива се изводи по оригиналној методи коју су описали Misra и Fridovich (1972),[238] уз одређене модификације. Метода се заснива на способности SOD да инхибира спонтану аутооксидацију епинефрина (адреналина) у базној средини на pH 10.2.

Адреналин је прилично стабилан у киселој средини. Аутооксидација адреналина је иницирана траговима тешких метала присутних као нечистоће у реагенсима. При оксидацији адреналина до адренохрома индиректно настаје и супероксид анјон, који постаје супстрат за супероксид дисмутазу (*Схема 4.17.*). O_2^- такође реагује и са адреналином, при чему убрзава његову оксидацију. SOD спречава овај процес реакцијом са O_2^-, при чему знатно успорава оксидацију адреналина. Активност овог ензима се изражава у релативним јединицама, које се добијају мерењем апсорбанце

насталог црвеног производа оксидације адреналина на 485 nm, без присуства SOD (контрола) и у присуству SOD (анализа). Активност SOD у узорку се израчунава као проценат инхибиције аутооксидације адреналина.



епинефрин адренохром

Схема 4.17. Аутооксидација епинефрина и настајање супероксидног анјона (O_2^-)као главног супстрата за SOD

Реагенси:

1. Хлороводонична киселина (HCl, 0.02 M);
2. Натријум карбонатни пуфер ($NaHCO_3$-Na_2CO_3 пуфер, 0.05 M, pH 10.20 до 10,25 са 1.00×10^{-4} M EDTA);
3. Епинефрин (0.01 у 0.02 M HCl);
4. Узорак – хомогенати ткива.

Поступак:

Одређивање V_o – Одмерити у кивету 925 μL карбонатног пуфера и 50 μL пуфера који је коришћен за прављење хомогената (PBS), измешати и са овом киветом подесити нулу на спектрофотометру. Затим додати 25 μL епинефрина, одмах измешати и почети са бележењем апсорбанце на 485 nm у временским интервалима од 10 s, у периоду од 6 min. Након мерења израчунава се ΔA/min, а вредности треба да буду у опсегу 0.02 – 0.025 (V_o). У случају да вредности излазе из овог опсега потребно је разблажити раствор епинефрина, како би се добиле вредности у датом опсегу.

Одређивање V_{SOD} – Одмерити у кивету 925 μL карбонатног пуфера и 50 μL узорка, измешати и са овом киветом подесити нулу на спектрофотометру. Затим додати 25 μL епинефрина (или одговарајућу запремину утврђену при одређивању V_o), одмах измешати и почети са бележењем апсорбанце на 485 nm у временским интервалима од 10 s, у периоду од 6 min. За израчунавање ΔA/min узети исти временски интервал који је коришћен код одређивања V_o. Израчуната вредност ΔA/min представља V_{SOD}. Релативна јединица активности SOD је дефинисана као она активност која доводи до 50% инхибиције аутооксидације адреналина под одређеним условима. Изабрана је она концентрација адреналина која ће у контроли дати промену апсорбанце у минути од 0.025. Изабрана је промена апсорбанције у минути од 0.025, јер је утврђено

да SOD тада постиже највиши проценат инхибиције аутооксидације адреналина. Активност SOD у релативним јединицама израчунава се из формуле (24):

$$\text{SOD (U/mL)} = \frac{V_0 - V_{SOD}}{V_0/2} \quad (24)$$

Активност SOD по L узорка добија се из формуле (25):

$$\text{SOD (U/L)} = \text{SOD U/mL} \times \frac{V_{ук}}{V_{уз}} \times 1000 \quad (25)$$

где је: $V_{ук}$, укупна запремина (1 mL); $V_{уз}$, запремина узорка (0.05 mL).

Каталитичка активност SOD изражена у интернационалним јединицама (U) по mg протеина у хомогенату добија се из формуле (26):

$$\text{SOD (U/mg протеина)} = \frac{\text{SOD U/L}}{C_{\text{протеина}}\ \text{mg/L}} \quad (26)$$

где је: SOD U/L, каталитичка активност SOD изражена у интернационалним јединицама (U) по L хомогената; $C_{\text{протеина}}$ mg/L, концентрација протеина изражена у милиграмима по L хомогената.

4.10.4.4. Одређивање садржаја редукованог глутатиона (GSH)

Методу по којој се одређује концентрација редукованог глутатиона (GSH) описао је Ellman (1959).[308] Једињење 2,2'-динитро-5,5'-дитио-дибензоева киселина (DTNB), познатије као Ellman-ов реагенс, се уопштено користи за детекцију тиолних компоненти.

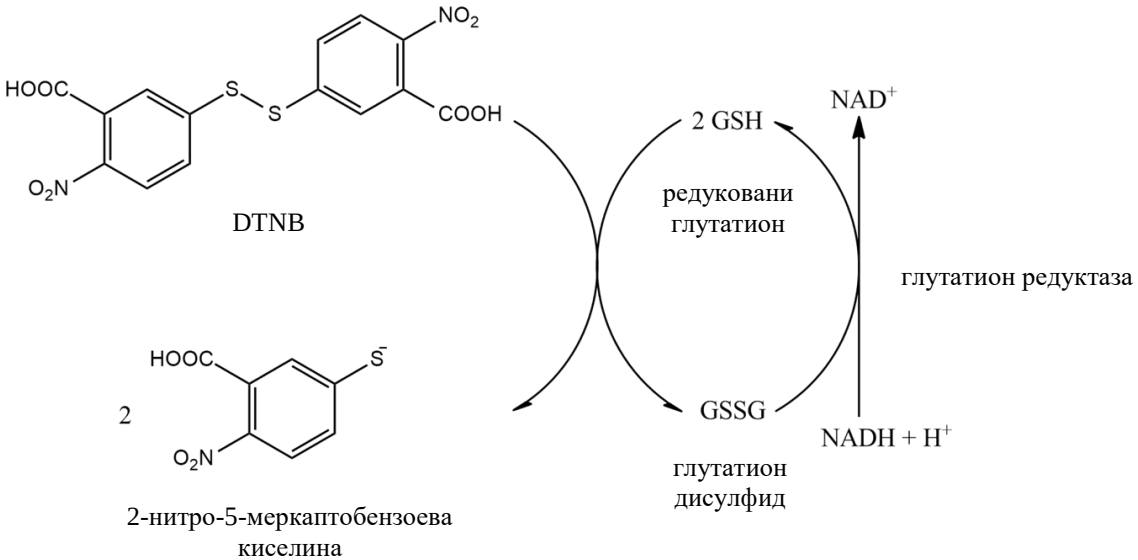


Схема 4.18. Реакција редукованог глутатиона (GSH) са DTNB, при чему настаје 2-нитро-5-меркаптобензоева киселина

Одређивање нивоа редукованог глутатиона базира се на способности SH-групе да редукује DTNB, при чему настаје 1 mol 2-нитро-5-меркаптобензоеве киселине (NTB) по молу SH и глутатион дисулфид (GSSG). Пошто је 2-нитро-5-меркаптобензоева киселина производ жуте боје, то се концентрација GSH у испитиваном узорку може

одредити колориметријски мерењем апсорбанце на 412 nm. GSH се регенерише из GSSG помоћу глутатион редуктазе, па поново може реаговати са DTNB градећи 2-нитро-5-меркаптобензоеву киселину, што повећава осетљивост методе. Реакција GSH са DTNB је приказана на *Схеми 4.18*.

Реагенси:

1. Калијум фосфатни пуфер (K_2HPO_4, 0.2 M у 2 mM EDTA, pH 9.0);
2. 2,2′-динитро-5,5′-дитио-дибензоева киселина (DTNB, 10 mM у калијум фосфатном пуферу);
3. Узорак – хомогенати ткива.

Поступак:

У кивете одмерити 0.1 mL узорка, додати 1.8 mL калијум фосфатног пуфера и 0.04 mL DTNB. Упоредо се припрема и бланко проба која садржи све реагенсе и 0.1 mL дестиловане воде, и њом се подешава нула на спектрофотометру. Смеша се добро промеша и инкубира се 25 min на 25°C, у мраку. По истеку времена, мери се апсорбанца жутог комплекса на 412 nm. Концентрација GSH се очитава са стандардне праве која је конструисана коришћењем воденог раствора глутатиона (GSH) као стандарда. Прави се концентровани стандард од 100 mg/mL GSH, а од њега се даље праве разблажења са дестилованом водом, при чему се добијају стандарди нижих концентрација који покривају опсег референтних вредности. Концентрација GSH у ткивима изражена је у mg/L хомегената и израчунава се помоћу формуле (27):

$$\text{GSH (mg/L)} = C_{GSH} \times \frac{V_{ук}}{V_{уз}} \times 1000 \qquad (27)$$

где је: C_{GSH}, концентрација GSH очитана са стандардне праве изражена у mg/mL; $V_{ук}$, укупна запремина (0.97 mL); $V_{уз}$, запремина узорка (0.05 mL).

Концентрација GSH у хомогенатима ткива изражена у mg GSH по g протеина у хомогенату добија се из формуле (28):

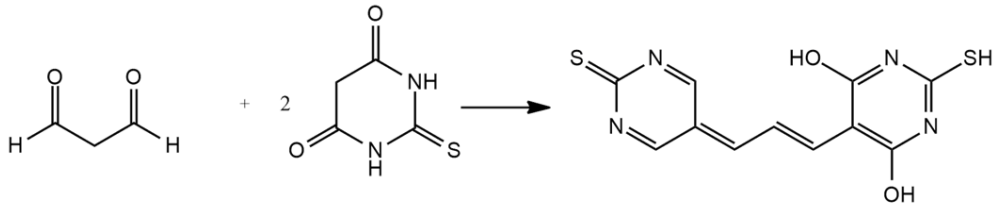
$$\text{GSH (mg/g протеина)} = \frac{\text{GSH mg/L}}{C_{протеина}\ \text{g/L}} \qquad (28)$$

где је: GSH mg/L, концентрација GSH изражена у милиграмима по L хомогената; $C_{протеина}$ g/L, концентрација протеина изражена у грамима по L хомогената.

4.10.4.5. Одређивање садржаја тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци (TBARS)

Реактивна једињења кисеоника деградирају полинезасићене липиде, при чему настаје малондиалдехид (MDA), као један од крајњих производа липидне пероксидације.[157] Овај реактивни алдехид је један од многих реактивних електрофилних врста које узрокују оксидативни стрес у ћелијама и са протеинима формира ковалентне адукте. Количина овог алдехида користи се као биомаркер за мерење нивоа оксидати-

вног стреса у организму. Садржај малондиалдехида у узорцима одређен је методом коју су описали Ohkawa *et al.* (1979)[309] коришћењем 1,1,3,3-тетраетоксипропана као стандарда за калибрациону криву. Концентрација тиобарбитурна киселина-реагујућих супстанци (TBARS) се одређује у еквивалентима MDA, спектрофотометријским тестом који се заснива на апсорпционом максимуму комплекса малондиалдехида и осталих TBARS са тиобарбитурном киселином на 535 nm. Принцип ове методе се заснива на реакцији тиобарбитурне киселине са MDA приказаној на *Схеми 4.19*.



MDA TBA MDA-TBA комплекс

Схема 4.19. Реакција малондиалдехида (MDA) са тиобарбитурном киселином (TBA)

Реагенси:

1. Натријум додецил сулфат (SDS, 8.1%);
2. Сирћетна киселина (CH_3COOH, 20%, pH 3.5);
3. Натријум хидроксид (NaOH, 0.05 M);
4. Тиобарбитурна киселина (TBA, 0.8% у 0.05 M NaOH);
5. Узорак – хомогенати ткива.

Поступак:

У епрувету одмерити 0.1 mL узорка, додати 0.2 mL SDS, 1.5 mL сирћетне киселине и 1.5 mL TBA. Смеша се потом загрева у кључалом воденом купатилу (95°C) у трајању од 60 min. Након центрифугирања 10 min, на 4 000 o/min, мери се апсорбанца насталог ружичастог комплекса на 535 nm.

За израчунавање количине TBARS коришћена је стандардна права која је конструисана употребом стандарда 1,1,3,3-тетраетоксипропана (MDA) концентрације од 1 − 16 μmol/L. Концентрација MDA у хомогенатима бубрега и јетре, изражена у nmol MDA по mg протеина у хомогенату, добија се из формуле (29):

$$\text{TBARS (MDA nmol/mg протеина)} = \frac{\text{MDA nmol/L}}{\text{C}_{\text{протеина}}\ \text{mg/L}} \qquad (29)$$

где је: MDA nmol/L, концентрација MDA очитана са стандардне праве; $C_{протеина}$ mg/L, концентрација протеина изражена у милиграмима по L хомогената.

4.10.5. Хистопатолошко испитивање ткивних исечака бубрега и јетре пацова

Како би се испитао утицај третмана испитиваним екстрактима на ткивну структуру бубрега и јетре, делови ткива су подвргнути хистопатолошкој анализи. Најпре су исечци ткива фиксирани у пуферисаном раствору формалина (4%, pH 7.4), при чему однос ткива и фиксатива треба да буде 1:10. Фиксација ткива је трајала 24 h. Након тога, узорци су подвргнути процесу припреме у аутоматизованом ткивном процесору. Прво се дехидратишу у серији раствора етанола растуће концентрације. Врши се просветљавање узорака у ксилолу, а затим се узорци третирају парафином, калупе се у парафинске блокове и на микротому се праве ткивни пресеци дебљине 4-6 μm. Узорци се поставе на стаклене плочице и подлежу процесу бојења хематоксилином па еозином (H&E бојење), коме претходи депарафинизација и рехидратација.

Овакав поступак припреме хистолошких препарата има за циљ да одржи узорак у стању које је што приближније нативном и очува што више карактеристика узорка. Овако припремљени хистолошки препарати бубрега и јетре експерименталних животиња анализирани су под светлосним микроскопом у циљу уочавања нарушавања структуре ткива и хистопатолошких промена. Фотографије сваке плочице су снимане под увећањем 40× или 100×.

4.10.6. Испитивање генотоксичности

4.10.6.1. Одређивање степена оштећења ДНК (алкална верзија Комет теста)

Реагенси:

1. „Нормална" агароза 1.5% у PBS-у (PBS: 20 mM Na_2HPO_4, 10 mM KCl, 70 mM KH_2PO_4, 340 mM NaCl, pH 7.4);
2. Агароза са ниском тачком топљења у PBS-у (1%, LMPA – *енг.* „low melting point agarose");
3. HBSS пуфер (0.14 g/L $CaCl_2$, 0.4 g/L KCl, 0.06 g/L KH_2PO_4, 0.1 g/L $MgCl_2 \times 6H_2O$, 0.1 g/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 8.0 g/L NaCl, 0.35 g/L $NaHCO_3$, 0.09 g/L $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$, 1.0 g/L D-глукоза, 20 mM EDTA и 10% DMSO);
4. Пуфер за лизу (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10.0);
5. Пуфер за електрофорезу (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0);
6. Пуфер за неутрализацију (0.4 Tris-HCl, pH 7.4);
7. Етанол (70 и 97%);
8. Боја за визуализацију комета етидијум бромид;
9. Узорак – ткиво.

Поступак:

Стаклене плочице се оперу детерџентом, осуше и обришу 70% етанолом. За припремање плочица користи се 1.5% „нормална" агароза у PBS-у. За припремање узорака користи се 1% LMPA агароза. Узорку ткива јетре и бубрега додаје се по 1 mL свеже припремљеног и охлађеног HBSS пуфера, узорак се уситни и процеди. Наведени поступак се понавља три пута и потом се прикупља коначна суспензија ћелија.

Из смеше која се састоји од 10 μL ћелијске суспензије и 75 μL 1% LMPA одпипетира се 85 μL, наноси се на претходно припремљене плочице и одмах се прекрије са покровним стаклом како би се ћелијска суспензија заједно са LMPA распоредила у танком слоју по предметном стаклу. Након 10 min, пажљиво се уклоне покровна стакла и нанесе се 100 μL 1% LMPA. После додатних 10 min плочице се поређају у пластичне посуде са пуфером за лизу. Након 1.5 h на 4ºC, плочице се пребацују у пластичне посуде са пуфером за електрофорезу, 30 min пре хоризонталне електрофорезе (2 kV и 139 mA током 30 min). Плочице се изваде из кадице за електрофорезу, обришу се и поређају у пластичне посуде са пуфером за неутрализацију (0.4 Tris-HCl, pH 7.4, на собној температури 3 пута по 5 min), а затим у 97% етанолу 20 min.[310] Пре анализирања неопходно је да се плочице осуше у *Easy breeze gel dryer*-у 30 min или током ноћи на собној температури, а затим се боје етидијум бромидом (80 μL) и покрију покровним стаклом. Применом флуоресцентног микроскопа Nikon (Ti-Eclipse) анализирају се и сликају ћелије, за сваки узорак врши се 3 мерења по 100 ћелија.

4.10.6.2. Класификација и дефинисање укупног скора оштећења ДНК

Степен оштећења ДНК мерен је помоћу две комплементарне методе, квантитативне и квалитативне методе дистрибуције оштећења. Комете су прво визуално анализиране и класификоване у пет категорија, дефинисаних као 0, 1, 2, 3 и 4; при чему је класа 0 – неоштећена ДНК; класе 1, 2 и 3 – мање, средње и дуге ДНК миграције и класа 4 – максимално оштећење ДНК.[311] Укупан скор се израчунава применом формуле (30):[312]

$$\text{Укупан скор} = (\%\ \text{ћелија у класи 0 x 0}) + (\%\ \text{ћелија у класи 1 x 1}) + (\%\ \text{ћелија у класи 2 x 2}) + (\%\ \text{ћелије у класи 3 x 3}) + (\%\ \text{ћелија у класи 4 x 4}) \quad (30)$$

Проценат редукције (%R) у укупном скору након третмана са метанолним екстрактима испитиваних биљака, а у циљу утврђивања антигенотоксичног ефекта, рачуна се применом формуле (31):[312]

$$\%\text{R} = \frac{a-b}{a-c} \times 100 \quad (31)$$

Где је a – средња вредност укупног скора у позитивној контроли (група II); b – средња вредност укупног скора у групи третираној екстрактима биљака из рода *Filipendula*; c – средња вредност укупног скора у негативној контроли (група I).

4.11. Статистичка обрада података

Сви резултати су приказани као средње вредности наведеног броја понављања ± стандардна девијација (С.Д.) или ± стандардна грешка средње вредности (С.Е.М.), осим ако није назначено другачије. Добијени подаци су обрађени у статистичком програму за обраду података SPSS version 20.0, за оперативни систем Windows. Разлике између контролних и експерименталних група одређене су употребом једноставне анализе варијансе (one-way analysis ANOVA) коришћењем Tukey, Boniferroni и Fisher LSD тестова, на нивоу значајности 0.05 ($p < 0.05$).

Резултати истраживања

5

I ФИТОХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА

5.1. Количина фенолних једињења у екстрактима биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

Како би се добила примарна информација о врстама и садржају фенолних једињења у испитиваним метанолним екстрактима надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* (FUA и FUR) и *F. hexapetala* (FHA и FHR) коришћене су поуздане спектрофотометријске методе, а количина укупних једињења изражена је у одговарајућим еквивалентима референтних фенолних једињења. Испитиван је укупан садржај фенолних једињења, а затим су одређене и количине укупних флавоноида, флавонола и фенолних киселина. Из групе танина у екстрактима је одређен садржај кондензованих танина и галотанина, а такође је одређивана и укупна количина антоцијана, као и количина мономерних антоцијана. Резултати испитивања фенолних једињења у екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala* приказани су у *Табели 5.1*.

Резултати испитивања садржаја укупних фенолних једињења помоћу Folin-Ciocalteu-ове методе указују да је највећа количина фенола присутна у екстракту корена *F. ulmaria,* и то у количини 287.77 mg GKE/g. Нешто нижа количина фенолних једињења забележена је у екстрактима надземних делова обе биљке, при чему је FHA екстракт нешто богатији фенолним једињењима (267.20 mg GKE/g) у односу на FUA (249.53 mg GKE/g), али се ове вредности статистички значајно не разликују ($p > 0.05$). С друге стране, најмања количина укупних фенолних једињења у односу на остале испитиване екстракте ($p < 0.05$) квантитативно је доказана у екстракту корена *F. hexapetala* (219.20 mg GKE/g).

Количине укупних флавоноида и флавонола у екстрактима испитиване су методама помоћу алуминијум(III) хлорида, а резултати су изражени у еквивалентима рутина по граму сувог екстракта (mg RUE/g). Поредећи добијене резултате за количине обе групе фенолних једињења можемо уочити да вредности прате сличан тренд. Највећа количина флавоноида и флавонола квантификована је у екстракту надземног дела *F. hexapetala* (91.81 и 52.90 mg RUE/g). Потом следи екстракт надземног дела *F. ulmaria* са скоро двоструко нижом количном флавоноида (45.47 mg RUE/g) и флавонола (37.05 mg RUE/g) у односу на FHA. Знатно ниже вредности забележене су код екстраката корена обе биљке, посебно што се тиче количине укупних флавонола.

Резултати за укупну количину фенолних киселина у екстрактима изражени су у еквивалентима кафеинске киселине (mg KKE/g). Екстракти корена обе испитиване биљке (FUR и FHR) имају приближно исти садржај фенолних киселина (57.35 и 55.52 mg KKE/g), док надземни делови садрже нешто мању количину ових фенолних једињења. Поређењем резултата за обе биљке може се закључити да је *F. ulmaria* нешто богатија фенолним киселинама, у односу на *F. hexapetala*.

Табела 5.1. Садржај укупних фенолних једињења и појединих група фенолних једињења у метанолним екстрактима биљака F. ulmaria и F. hexapetala

*Испитивани екстракти**	*Количина фенолних једињења#*			
	Садржај укупних фенолних једињења (mg GKE/g)	Количина укупних флавоноида (mg RUE/g)	Количина укупних флавонола (mg RUE/g)	Количина укупних фенолних киселина (mg KKE/g)
FUA	249.53 ± 10.48[а]	45.47 ± 3.43[а]	37.05 ± 2.38[а]	47.47 ± 1.31[а]
FUR	287.77 ± 11.57[б]	15.50 ± 1.76[б]	0.10 ± 0.01[б]	57.35 ± 2.06[б]
FHA	267.20 ± 11.06[а, б]	91.81 ± 8.36[в]	52.90 ± 4.28[в]	31.29 ± 0.99[в]
FHR	219.20 ± 10.63[в]	5.26 ± 0.89[г]	1.36 ± 0.13[б]	55.52 ± 1.65[б]
	Количина кондензованих танина (mg GKE/g)	Количина галотанина (mg GKE/g)	Количина мономерних антоцијана (mg Cy 3-glc/g)	Количина укупних антоцијана (mg Cy 3-glc/g)
FUA	183.49 ± 10.11[а]	33.86 ± 2.16[а]	0.68 ± 0.02[а]	1.18 ± 0.10[а]
FUR	250.83 ± 8.32[б]	60.91 ± 3.22[б]	0.16 ± 0.01[б]	1.11 ± 0.09[а]
FHA	87.55 ± 6.35[в]	33.67 ± 2.12[а]	3.34 ± 0.26[в]	4.50 ± 0.65[б]
FHR	213.71± 9.76[а]	48.53 ± 2.87[в]	0.01 ± 0.001[б]	1.15 ± 0.06[а]

* FUA – екстракт надземног дела *F. ulmaria*; FUR – екстракт корена *F. ulmaria*; FHA – екстракт надземног дела *F. hexapetala*; FHR – екстракт корена *F. hexapetala*.
# GKE – еквиваленти галне киселине; RUE – еквиваленти рутина; KKE – еквиваленти кафеинске киселине; Cy 3-glc – еквиваленти цијанидин 3-гликозида.
Резултати су изражени као средња вредност три независна мерења ± С.Д. (n = 3). Вредности у колони означене различитим словима у суперскрипту се статистички значајно разликују на $p < 0.05$.

Што се тиче количине танина у екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, кондензованих танина и галотанина има знатно више у екстрактима корена обе биљке. Најбогатији кондензованим танинима је FUR екстракт (250.83 mg GKE/g), потом следи FHR (213.71 mg GKE/g). Екстракт надземног дела *F. ulmaria* не заостаје пуно за овим вредностима кондензованих танина (183.49 mg GKE/g) тако да, генерално гледано, *F. ulmaria* поседује већу количину кондензованих танина у односу на *F. hexapetala*. У поређењу са количином кондензованих танина, забележен је сличан однос садржаја галотанина у екстрактима. Највећа количина галотанина квантификована је у екстрактима корена, и то 60.91 mg GKE/g у FUR и 48.53 mg GKE/g у FHR. Екстракти надземних делова обе биљке имају знатно мању и приближно једнаку количину галотанина ($p > 0.05$).

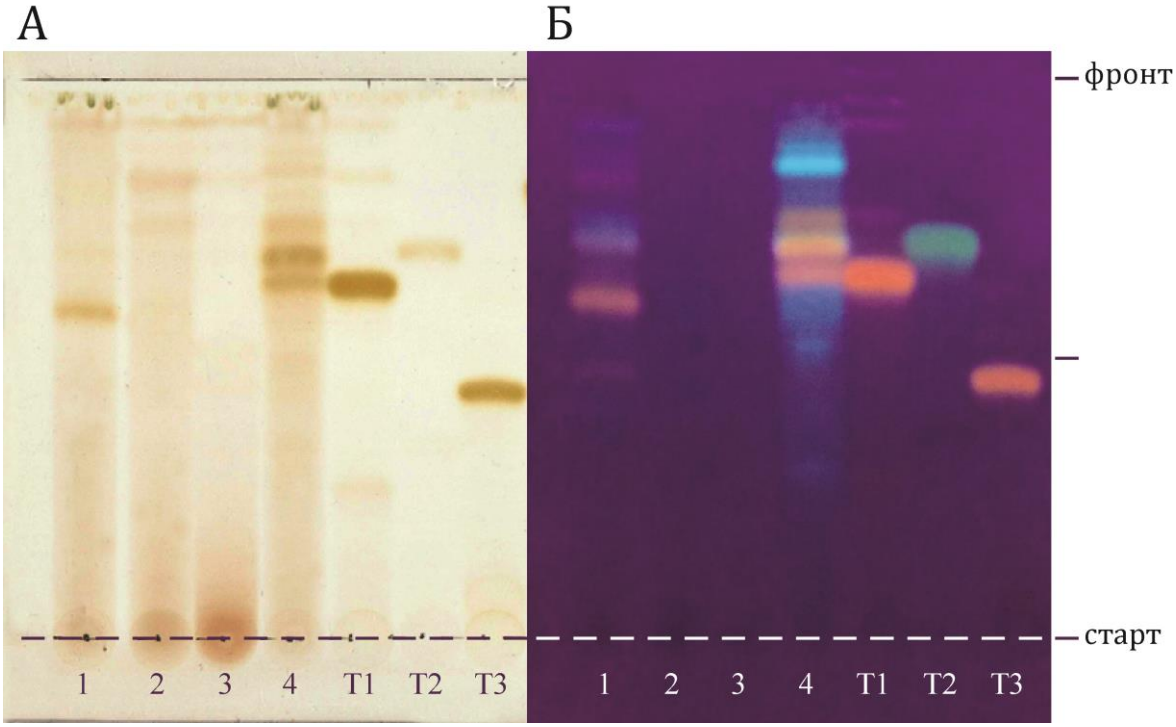
Количина мономерних и укупних антоцијана у испитиваним екстрактима одређена је *„singl"* pH методом и pH диференцијалном методом, а резултати су изражени у

еквивалентима цијанидин 3-гликозида (mg Cy 3-glc/g). Резултати квантитативног одређивања антоцијана у обе методе указују да само екстракт надземног дела *F. hexapetala* садржи знатно већу количину, како мономерних (3.34 mg Cy 3-glc/g), тако и укупних антоцијана (4.50 mg Cy 3-glc/g), у односу на остале екстракте ($p < 0.05$). Узимајући у обзир садржај укупних фенолних једињења, као и количине појединих група фенолних једињења, количина антоцијана у испитиваним екстрактима је незнатна.

5.2. TLC и HPTLC стандардизација екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

Стандардизација, односно утврђивање присуства референтних једињења у екстрактима надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* (FUA и FUR) и *F. hexapetala* (FHA и FHR), спроведена је коришћењем две хроматографске методе, танкослојне хроматографије – TLC и танкослојне хроматографије високих перформанси – HPTLC.

За TLC стандардизацију коришћене су три референтне компоненте: хиперозид, спиреозид и рутин. На *Слици 5.1.* приказан је TLC хроматограм испитиваних екстраката дериватизован NPR/PEG реагенсом и снимљен на видљивој светлости (А) и изложен УВ зрацима таласне дужине 365 nm (Б).



Слика 5.1. TLC хроматограм метанолних екстраката надземних делова и корена биљака F. ulmaria и F. hexapetala и референтних једињења – А (NPR/PEG, VIS); Б (NPR/PEG, 365 nm).

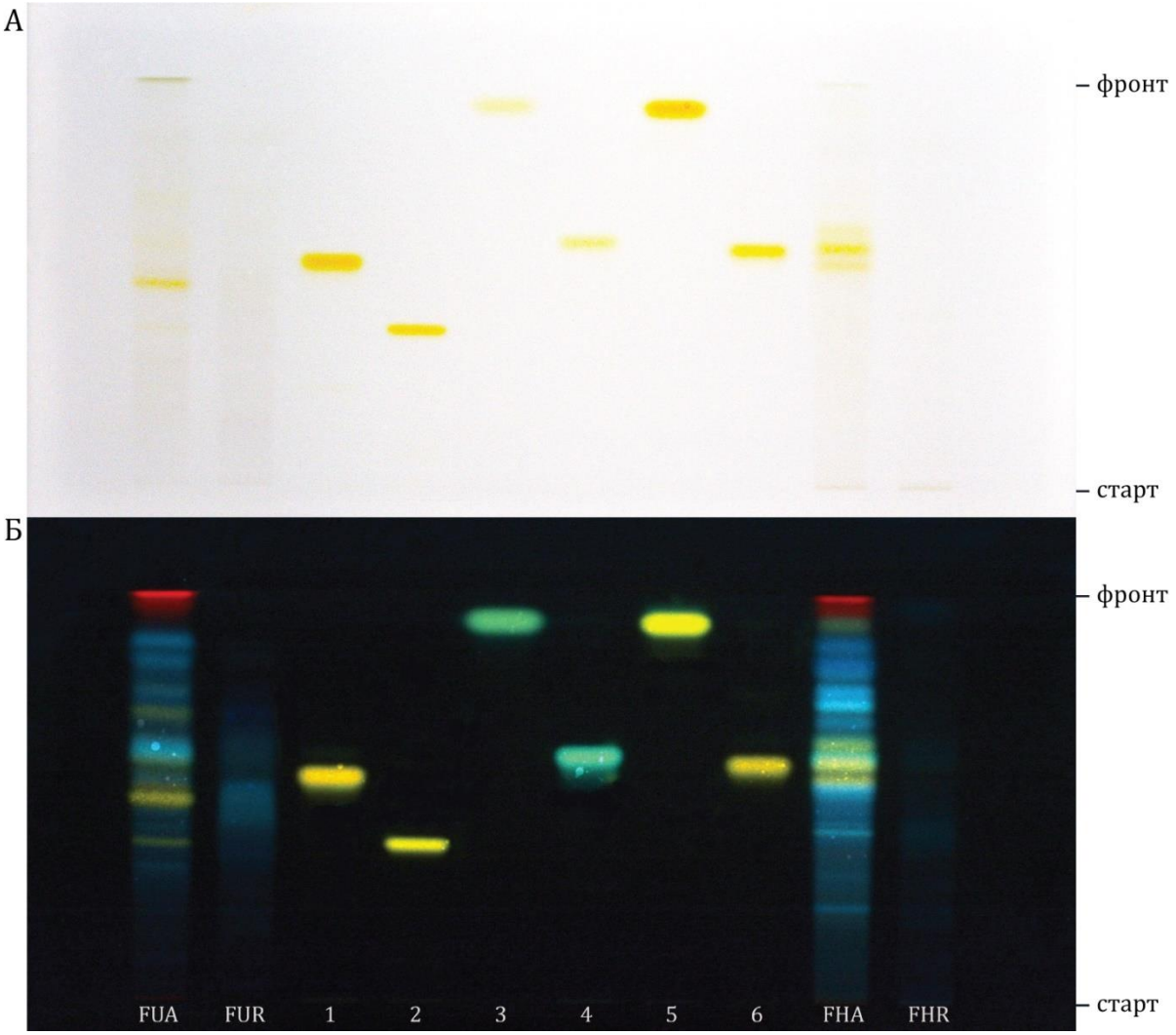
1 – FUA, екстракт надземног дела F. ulmaria; 2 – FUR, екстракт корена F. ulmaria; 3 – FHR, екстракт корена F. hexapetala; 4 – FHA, екстракт надземног дела F. hexapetala; T1 – хиперозид (R_f ~ 0.7); T2 – спиреозид (R_f ~ 0.75); T3 – рутин (R_f ~ 0.5).

На добијеном TLC хроматограму може се јасно уочити флуоресцентна зона наранџасте боје, на R_f вредности од приближно 0.7, која одговара хиперозиду (кверцетин-3-*O*-галактозид, **T1**) која се може видети само још код екстракта надземног дела *F. hexapetala* (**4**). Међутим, друго референтно једињење, рутин (кверцетин-3-*O*-рутинозид, **T3**) присутан је у незнатној количини само у екстрактима надземног дела *F. ulmaria* (**1**). Основни стандард за идентификацију биљака из рода *Filipendula*, спиреозид (кверцетин-4'-*O*-глукозид, **T2**) идентификован је у надземним деловима обе биљке као њихов главни конституент. Спиреозид се на хроматограму може уочити као плава флуоресцентна зона изнад зоне хиперозида и, на основу интензитета боје, може се рећи да је FHA екстракт нешто богатији овим једињењем у односу на FUA.

Осим тога, на хроматограму се код екстраката надземних делова обе биљке могу уочити додатне плаве флуоресцентне зоне у вишим нивоима R_f вредности, које највероватније потичу од фенолних киселина. Ниједно тестирано референтно једињење није идентификовано у екстрактима корена обе биљке (**2** и **3**).

Стандардизација испитиваних екстраката применом HPTLC хроматографске анализе открила је присуство додатних фенолних једињења у екстрактима надземних делова обе биљке. Поред спиреозида (**4**), хиперозида (**1**) и рутина (**2**), за хроматографију су употребљени још и апигенин (**3**), кверцетин (**5**) и изокверцитрин (**6**). HPTLC хроматограми, снимљени на видљивој светлости (А) и под УВ зрацима таласне дужине 366 nm (Б), приказани су на *Слици 5.2.*

У екстракту надземног дела *F. ulmaria* HPTLC анализом, поред рутина и спиреозида, детектовано је и присуство изокверцитрина. Спиреозид је идентификован и као саставни део екстракта надземног дела *F. hexapetala*, а поред овог једињења FHA екстракт садржи хиперозид, кверцетин и изокверцитрин. Поред тога, у екстрактима надземних делова обе биљке изнова су уочене плаве флуоресцентне зоне фенолних киселина које су знатно израженије у екстракту надземног дела *F. hexapetala*. Као што је био случај при претходној стандардизацији, у екстрактима корена обе биљке није идентификована ниједна коришћена референтна компонента, с тим да су и код њих присутне плаве флуоресцентне зоне, што се није видело у претходној анализи.



Слика 5.2. HPTLC профили метанолних екстраката F. ulmaria (FUA и FUR) и F. hexapetala (FHA и FHR), као и референтних једињења (1–6).

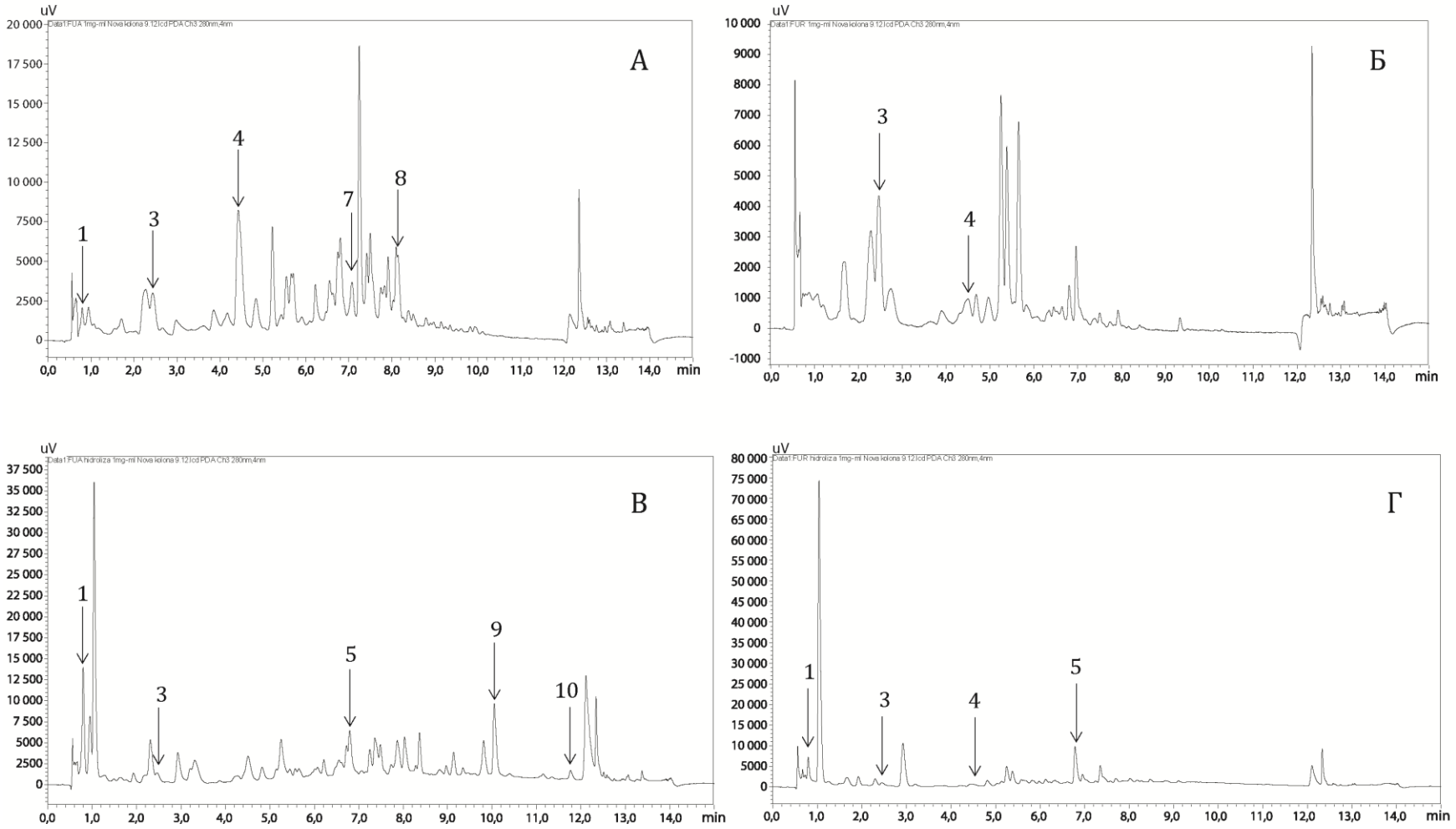
1 – хиперозид (R_f ~ 0.55), 2 – рутин (R_f ~ 0.37), 3 – апигенин (R_f ~ 0.95), 4 – спиреозид (R_f ~ 0.6), 5 – кверцетин (R_f ~ 0.92), 6 – изокверцитрин (R_f ~ 0.57). А – NPR/PEG видљива светлост, Б – NPR/PEG 366 nm.

5.3. HPLC анализа екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

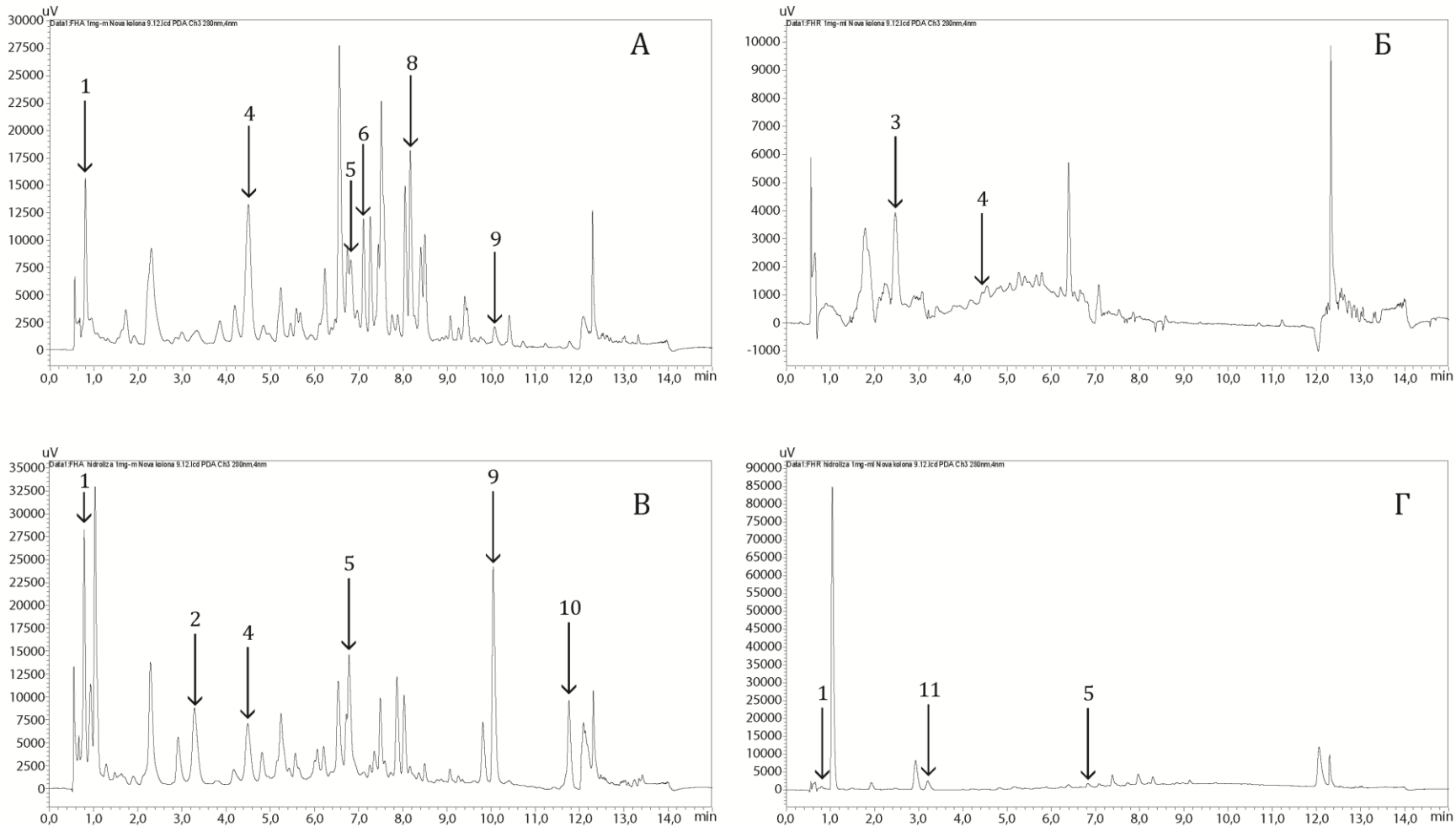
Течна хроматографија високих перформанси (HPLC) примењена је за анализирање хемијског састава и квантификацију појединих фенолних једињења присутних у испитиваним екстрактима биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*. За HPLC анализу као стандарди су коришћена чиста фенолна једињења која су идентификована на основу детекције раздвојених пикова на 280 и 320 nm. Једињења су у екстрактима идентификована на основу поређења апсорпционих UV-VIS спектара стандардних једињења, као и њихових ретенционих времена. Како би утврдили присуство деривата фенолних једињења у испитиваним екстрактима, HPLC анализа спроведена је пре и након хидролизе екстраката. Добијени HPLC хроматограми пре и након хидролизе екстраката *F. ulmaria* приказани су на *Слици 5.3.*, док су хроматограми добијени истим начином анализе екстраката *F. hexapetala* приказани на *Слици 5.4*. Резултати квантитативног одређивања фенолних једињења идентификованих у испитиваним екстрактима пре и након хидролизе приказани су у *Табели 5.2*.

У екстракту надземног дела *F. ulmaria* (FUA) идентификовано је пет фенолних једињења, од укупно 11 коришћених у анализи. То су: гална киселина, катехин, епикатехин, рутин и спиреозид (*Слика 5.3. А*). У екстракту корена *F. ulmaria* (FUR) од свих референтних компоненти присутна су само два флавоноида, односно флаван-3-ола, и то катехин и епикатехин (*Слика 5.3. Б*). Након хидролизе екстраката *F. ulmaria* (*Слике 5.3. В, Г*), гална киселина детектована је, не само у хидролизованом FUA екстракту, већ и у хидролизованом FUR. Такође, у оба екстракта забележено је присуство елагинске киселине и катехина. FUA је, након хидролизе где су разграђени флавоноидни гликозиди спиреозид и рутин, садржао просте флавоноиде кверцетин и кемпферол.

Шест фенолних једињења је детектовано у екстракту надземног дела биљке *F. hexapetala* (FHA): гална и елагинска киселина, епикатехин, хиперозид, спиреозид и кверцетин (*Слика 5.4. А*). У поређењу са екстрактом надземног дела *F. ulmaria* (FUA), фенолна једињења која су идентификована у екстрактима обе биљке су гална киселина, епикатехин и спиреозид, флавоноидни гликозид који је карактеристичан за биљке из рода *Filipendula* Mill. У екстракту корена *F. hexapetala* (FHR) је идентификовано, као и код FUR, само два једињења, катехин и епикатехин (*Слика 5.4. Б*). С друге стране, у хидролизованом FHA екстракту (*Слика 5.4. В*), поред галне киселине, епикатехина и елагинске киселине, идентификована су још два фенолна једињења – кафеинска киселина и кемпферол, којих није било у почетном облику екстракта. Поред тога, у хидролизованом екстракту корена *F. hexapetala* забележено је присуство три фенолне киселине: галне, елагинске и ванилинске киселине (*Слика 5.4. Г*). Присуство галне и елагинске киселине евидентирано је и при анализирању HPLC хроматограма хидролизованог FUR екстракта, али ванилинска киселина је идентификована једино након хидролизе FHR.



Слика 5.3. HPLC профили метанолних екстраката F. ulmaria (FUA и FUR) пре (А, Б) и након хидролизе (В, Г).
Детекција је вршена на 280 nm. Идентификација пикова: 1 – гална киселина; 3 – катехин; 4 – епикатехин; 5 – елагинска киселина; 7 – рутин; 8 – спиреозид; 9 – кверцетин; 10 – кемпферол.



Слика 5.4. HPLC профили метанолних екстраката F. hexapetala (FHA и FHR) пре (А, Б) и након хидролизе (В, Г).
Детекција је вршена на 280 nm. Идентификација пикова: 1 – гална киселина; 2 – кафеинска киселина; 3 – катехин; 4 – епикатехин; 5 – елагинска киселина; 6 – хиперозид; 7 – рутин; 8 – спиреозид; 9 – кверцетин; 10 – кемпферол; 11 – ванилинска киселина.

Резултати квантитативне HPLC анализе садржаја фенолних једињења у испитиваним екстрактима пре и након хидролизе изражени су у милиграмима супстанце по граму сувог екстракта (mg/g) и дати су у *Табели 5.2*. Поређењем резултата анализе екстраката надземних делова обе биљке, јасно се уочава да је доминантно фенолно једињење у оба случаја (-)-епикатехин, у FUA забележена је количина од 39.24 mg/g епикатехина, док је у FHA садржај овог једињења скоро дупло већи 64.36 mg/g. У екстрактима корена обе испитиване биљке, поред ниског садржаја епикатехина, квантификована је знатна количина (+)-катехина, у FUR 17.17 mg/g, а у FHR 14.44 mg/g, па се може рећи да је катехин доминантни фенол идентификован у корену обе биљке. Такође, приближна количина катехина детектована је и у FUA екстракту (11.30 mg/g). Након хидролизе, концентрација катехина у екстрактима *F. ulmaria* је значајно смањена, док у хидролизованом FHR екстракту катехин уопште није детектован. Слична ситуација је била и са епикатехином, с тим што ово једињење после хидролизе није идентификовано у FUA и FHR. Ови резултати указују на деградацију поменутих једињења у киселим условима и на повишеној температури.

Што се тиче стандардних фенолних киселина, галне и елагинске киселине, гална киселина је квантификована у екстрактима оба надземна дела, али не и у екстрактима корена, при чему у знатно већој количини у FHA (6.21 mg/g), док је елагинска киселина присутна само у FHA, у количини од 8.83 mg/g. Хидролизом свих екстраката, садржај ове две киселине се значајно увећао код екстраката надземних делова обе биљке, где су оне већ идентификоване. Такође, квантификована је и извесна количина ових киселина у екстрактима корена обе биљке. Битно је напоменути и да је садржај елагинске киселине у екстрактима, у којима она није идентификована пре хидролизе (FUA, FUR и FHR), после хидролизе био прилично висок. Ови резултати могу бити објашњени присуством хидролизабилних танина (елагитанина и галотанина) у испитиваним екстрактима, који у својим структурама садрже велики број остатака ове две фенолне киселине, делимично или потпуно естерификованих са хидроксилним групама угљених хидрата. Додатне фенолне киселине идентификоване су у појединим хидролизатима екстраката. Присуство кафеинске киселине забележено је у FHA екстракту у количини 8.30 mg/g, што указује на присуство неких деривата ове киселине у основном облику поменутог екстракта. Такође, у FHR екстракту детектовано је присуство ванилинске киселине (3.28 mg/g), што је јасан знак присуства неких њених деривата у нехидролизованом облику овог екстракта.

У екстрактима надземних делова испитиваних биљака квантификовани су флавоноидни гликозиди, хиперозид, рутин и спиреозид, који се, као што је већ и поменуто, користе за стандардизацију екстраката биљака из рода *Filipendula*. Само у FUA екстракту забележено је присуство 6.22 mg/g рутина, у FHA је детектован хиперозид (14.87 mg/g), док је у оба екстракта присутан спиреозид, и то у преко 3.5 пута већој количини у FHA екстракту (21.80 mg/g) у односу на FUA (5.94 mg/g).

Табела 5.2. Фенолна једињења (mg/g) квантификована HPLC методом у метанолним екстрактима надземног дела и корена биљака F. ulmaria и F. hexapetala пре и након хидролизе [а]

	Фенолна једињења	Екстракти *F. ulmaria*				Екстракти *F. hexapetala*			
		Пре хидролизе		*Након хидролизе*		*Пре хидролизе*		*Након хидролизе*	
		FUA	FUR	FUA	FUR	FHA	FHR	FHA	FHR
1[б]	Гална киселина	0.74 ± 0.003	– [в]	7.02 ± 0.031	3.05 ± 0.024	6.21 ± 0.08	–	12.46 ± 0.03	0.44 ± 0.01
2	Кафеинска киселина	–	–	–	–	–	–	8.30 ± 0.02	–
3	(+)-Катехин	11.30 ± 0.106	17.17 ± 0.098	4.15 ± 0.016	2.50 ± 0.013	–	14.44 ± 0.12	–	–
4	(-)-Епикатехин	39.24 ± 0.141	3.12 ± 0.014	–	2.83 ± 0.011	64.36 ± 0.11	0.86 ± 0.06	30.75 ± 0.08	–
5	Елагинска киселина	–	–	8.87 ± 0.025	12.16 ± 0.037	8.83 ± 0.04	–	14.20 ± 0.07	4.59 ± 0.06
6	Хиперозид	–	–	–	–	14.87 ± 0.05	–	–	–
7	Рутин	6.22 ± 0.032	–	–	–	–	–	–	–
8	Спиреозид	5.94 ± 0.027	–	–	–	21.80 ± 0.02	–	–	–
9	Кверцетин	–	–	15.49 ± 0.074	–	4.49 ± 0.03	–	42.15 ± 0.05	–
10	Кемпферол	–	–	1.24 ± 0.009	–	–	–	7.06 ± 0.03	–
11	Ванилинска киселина	–	–	–	–	–	–	–	3.28 ± 0.04

[а] – Концентрација фенолних једињења изражена је у милиграмима по граму сувог екстракта (mg/g).
[б] – Нумерација референтног фенолног једињења на HPLC хроматограмима.
[в] – није идентификовано;
Резултати су изражени као средња вредност три независна мерења ± С.Д. (n = 3).

Како је број флавоноидних гликозида јако велики, то је и могућност њихове идентификације на основу референтних једињења значајно смањена. Из тог разлога, најчешће се врши хидролиза биљног материјала, при чему поменута група фенолних једињења такође хидролизује дајући шећерни остатак и флавоноидни агликон, који се даље једноставније може квантификовати. Флавоноиди квантификовани у екстрактима надземних делова обе биљке након хидролизе су кверцетин и кемпферол. Кверцетин је идентификован и у почетном (нехидролизованом) облику FHA екстракта (4.49 mg/g), али у хидролизату овог екстракта садржај кверцетина је значајно порастао (42.15 mg/g). У FUA пре хидролизе кверцетин није био присутан у количини која би се могла детектовати, али након овог поступка детектована је значајна количина овог флавоноида (15.49 mg/g). Повећан садржај кверцетина након хидролизе екстракти дугују, пре свега, хидролизирању присутних флавоноидних гликозида деривата кверцетина: хиперозида (кверцетин-3-*O*-галактозид), рутина (кверцетин-3-*O*-рутинозид) и спиреозида (кверцетин-4'-*O*-глукозид). Поређењем количине кверцетина у хидролизованим екстрактима и количине ова три гликозида кверцетина пре хидролизе, евидентно је да је садржај кверцетина у добијеним хидролизатима много већи него укупна количина детектованих флавоноидних гликозида. То даље води до закључка да у испитиваним екстрактима надземних делова постоји још деривата кверцетина који нису идентификовани овом HPLC анализом. Квантификовање флавоноида кемпферола у хидролизатима екстраката FUA (1.24 mg/g) и FHA (7.06 mg/g) такође индицира присуство неких деривата кемпферола у основним облицима екстраката надземних делова обе биљке.

5.4. LC-MS анализа екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

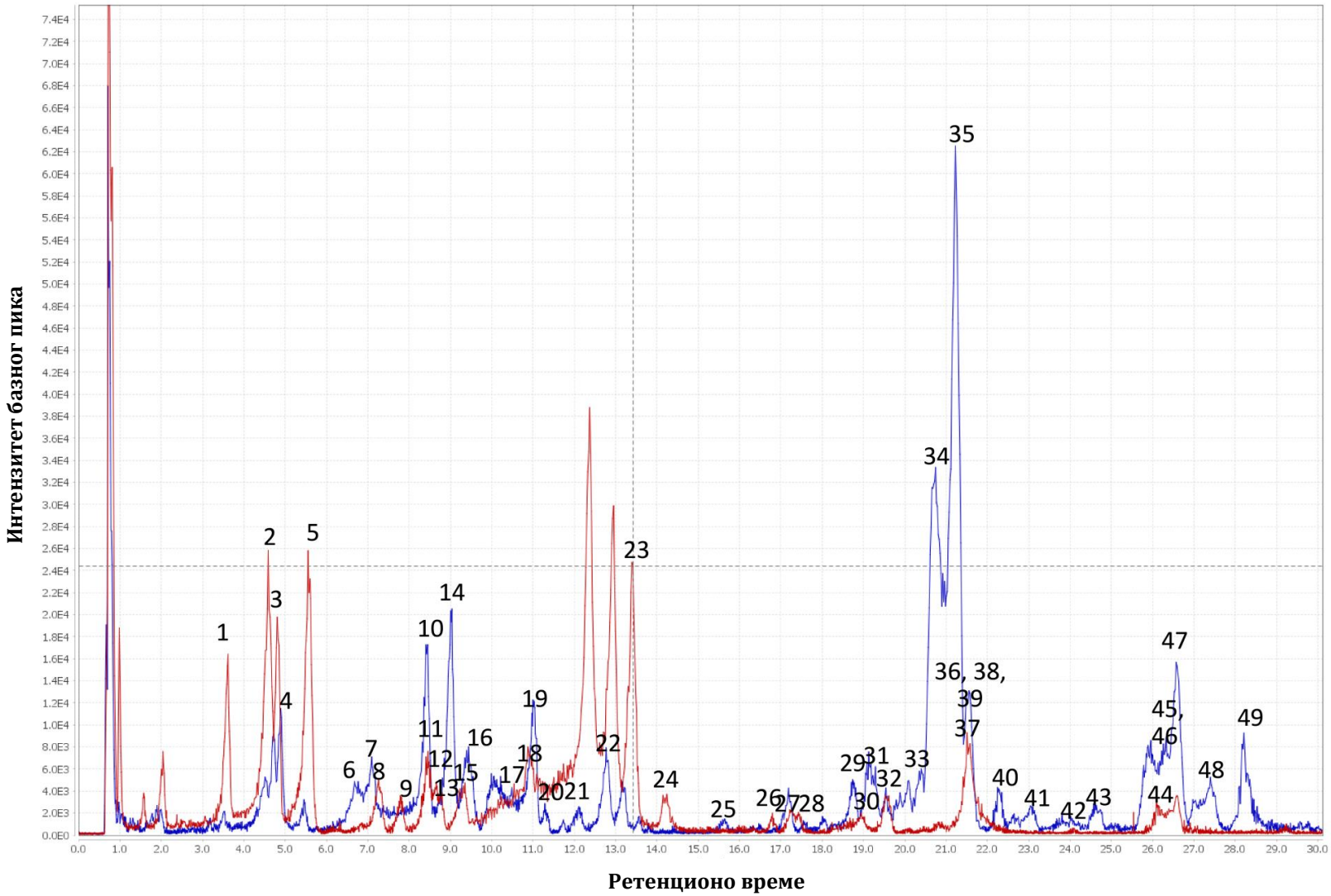
У циљу што прецизнијег утврђивања хемијског састава метанолних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, примењена је LC-MS анализа. За испитивање присуства фенолних једињења у екстрактима *F. ulmaria* (FUA и FUR) коришћена је UHPLC-DAD-MS^n техника, док је за испитивање екстраката *F. hexapetala* (FHA и FHR) употребљена UHPLC-DAD-HRMS техника (*Поглавље 4.4.2.*). Пикови фенолних једињења на добијеним хроматограмима свих испитиваних екстраката су идентификовани на основу аутентичних референтних једињења или коришћењем литературних података, применом софтвера за анализу података Thermo Xcalibur version 2.2. (Thermo Fisher Scientific Inc., Бремен, Немачка). Поменути литературни подаци су засновани на хроматографским анализама, како сваке испитиване биљке појединачно, тако и на научно публикованим анализама хемијског састава других биљних врста из рода *Filipendula*, као и на хроматографским параметрима самих фенолних једињења. Како је методологија LC-MS анализе екстраката била нешто другачија за *F. ulmaria* екстракте у односу на екстракте биљке *F. hexapetala*, то су и резултати ових испитивања презентовани у одвојеним табелама (*Табеле 5.3. и 5.4.*) и хроматограми су дати на засебним сликама (*Слике 5.5., 5.6. и 5.7.*).

Резултати аналитичке карактеризације фенолних једињења у екстрактима *F. ulmaria* (FUA и FUR) дати су у *Табели 5.3.*, док су LC-MS хроматограми представљени на *Слици 5.5*. UHPLC-DAD-MS^n анализа омогућила је идентификацију укупно 49 једињења у екстрактима *F. ulmaria*, било недвосмислено у поређењу са аутентичним референтним стандардима, било условно поређењем MS^n фрагментационих карактеристика једињења са подацима из литературе. Добијени резултати указују на присуство три главне групе фенолних конституената у испитиваним екстрактима FUA и FUR: проантоцијанидина, хидролизабилних танина и флавоноида.

Утврђено је присуство великог броја различитих димера, тримера и тетрамера процијанидина, као и галоилованих процијанидина, како у екстракту корена, тако и у екстракту надземног дела *F. ulmaria.* Иако је присуство већине детектованих процијанидина ограничено само на један биљни орган (нпр. једињења **7**, **16**, **20**, **22** и **25** су била присутна само у надземном делу *F. ulmaria*, а присуство једињења **8**, **9**, **11**, **12** и **13** забележено је само у корену *F. ulmaria*), једињења **5** ((епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин) и **23** ((епи)катехин-(епи)катехин-галат) су детектована и у надземном делу и у корену *F. ulmaria*. Приликом LC-MS анализе екстраката *F. ulmaria*, поред процијанидина који се углавном састоје од подјединица (епи)катехина, детектовано је и присуство серије процијанидина у чијем саставу се налазе остаци (епи)катехина и (епи)афзелехина (једињења **7**, **8**, **9**, **13**, **16**, **20** и **25**) који, према нашим сазнањима и базирано на литературним подацима, још увек нису идентификовани у биљци *F. ulmaria*. Мономерни катехин (**3**) је идентификован у FUA и FUR, док је епикатехин (**10**) био присутан само у FUA, а (епи)афзелехин није детектован. Такође, у испитиваним екстрактима детектован је и широк спектар хидролизабилних танина који се састоје од остатака галоилованих хексахидрокси-дифенил (HHDP) хексоза. Већина ових једињења је присутна у FUA екстракту (**4**, **17**, **21**, **29**, **38**, **40**, **45** и **49**). При тумачењу резултата добијених LC-MS анализом екстраката *F. ulmaria*, идентификовано је и неколико хидролизабилних танина (једињења **1**, **24**, **37** и **44**) који су били присутни само у FUR екстракту. Елагинска киселина није детектована ни у једном екстракту *F. ulmaria*, али мања количина једињења условно идентификованог као елагинска киселина-*O*-пентозид (**30**) била је присутна у FUR екстракту.

Осим кверцитрина (**47**), који је детектован у оба органа биљке *F. ulmaria*, присуство флавоноида ограничено је искључиво на FUA екстракт. Главни флавоноиди и флавоноидни гликозиди присутни у FUA били су кверцетин хексурониди (**34**, **35**), спиреозид (**46**) и кверцитрин (**47**). Поред наведених једињења, у FUA је забележено присуство флавоноидних гликозида који представљају деривате кверцетина, и то хиперозида (**33**), рутина (**36**) и изокверцитрина (**39**), као и хексозида кемпферола (**48**).

Поред ове три главне групе полифенолних једињења идентификованих у екстрактима биљке *F. ulmaria*, детектовано је и једињење гаултерин (**19**), као једини дериват салицилне киселине у овим екстрактима. Гаултерин је био присутан и у надземном делу и у корену *F. ulmaria*, али у нешто већој количини у надземном делу. У FUR екстракту гаултерин је детектован у врло малим количинама.



Слика 5.5. LC-MS хроматограми метанолних екстраката надземног дела (FUA – плаво) и корена (FUR – црвено) биљке F. ulmaria. Пикови су идентификовани на основу аутентичних референтних једињења или литературних података.

Табела 5.3. Фенолна једињења идентификована у екстрактима F. ulmaria (FUA и FUR) помоћу LC-DAD-MS^n анализе. Пикови су идентификовани поређењем са референтним једињењима[а] или базирано на коришћењу литературних података[б]

Број	Једињење	FUA Rt (min)	FUR Rt (min)	ESI-full MS$^-$ (m/z)	MS^2 фрагменти (m/z)[в]	DAD λ_{max} (nm)[г]	Референца за идентификацију[д]
1	HHDP-галоил-хексоза [б]	*н.д.*	**3.62**	633.2	615 (7) 481 (2) 463 (1) 421 (1) 331 (1) 301 (100) 275 (5)	196 (100) 223 (80) 280 (20)	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
2	(епи)катехин-(епи)катехин [б]	**4.51**	**4.59**	577.3	559 (20) 451 (45) 425 (100) 407 (50) 299 (10) 289 (25)	197 (100) 222 (75) 282 (15) 310 (10)	Piccinelli et al. (2016)[313] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
3	катехин [а]	**4.70**	**4.60**	289.1	245 (100) 321 (10) 205 (40) 179 (15)	196 (100) 222 (60) 281 (10)	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
4	дигалоил-HHDP-хексоза [б]	**4.89**	*н.д.*	785.2	633 (30) 615 (15) 483 (75) 419 (15) 331 (7) 301 (100) 275 (15) 249 (12)	223 (100) 281 (35)	*Barros et al. (2013)*[63]
5	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	**5.50**	**5.55**	865.3	847 (20) 739 (60) 713 (30) 695 (100) 587 (20) 577 (60) 575 (30) 451 (15) 449 (15) 425 (20) 407 (25) 287 (20)	196 (100) 220 (80) 282 (12)	Piccinelli et al. (2016)[313] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
6	(епи)катехин-(епи)катехин [б]	**6.68**	*н.д.*	577.3	559 (15) 451 (50) 425 (100) 407 (47) 299 (7) 289 (25) 287 (10)	223 (100) 287 (35) 314 (40)	Piccinelli et al. (2016)[313] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
7	(епи)афзелехин-(епи)катехин [б]	**7.10**	*н.д.*	561.3	543 (85) 435 (95) 425 (25) 407 (25) 381 (7) 329 (7) 289 (100)271 (20) 245 (5) 203 (1)	197 (100) 222 (80) 282 (15)	De Souza et al. (2008)[314]
8	(епи)афзелехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**7.26**	561.3	543 (855) 435 (100) 425 (25) 407 (25) 381 (7) 329 (7) 289 (90) 271 (20) 245 (5) 203 (1)	197 (100) 220 (80) 282 (15)	De Souza et al. (2008)[314]

9	(епи)катехин-(епи)афзелехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**7.79**	849.3	831 (35) 723 (75) 697 (15) 679 (50) 561 (55) 559 (100) 543 (10) 541 (10) 517 (10) 433 (15) 413 (10) 407 (20) 289 (15) 271 (10) 245 (5)	220 (100) 277 (10)	De Souza et al. (2008)[314]
10	епикатехин [а]	**8.45**	*н.д.*	289.1	271 (5) 245 (100) 231 (10); 205 (35) 179 (15)	197 (100) 223 (60) 281 (10)	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
11	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**8.50**	1153.4	1135 (50) 1027 (65) 1001 (45) 983 (100) 965 (15) 907 (30) 865 (80) 863 (65) 739 (45) 701 (30) 577 (25) 575 (20) 449 (20) 407 (15)	201 (80) 220 (100) 280 (10)	Piccinelli et al. (2016)[313] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
12	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**8.66**	865.4	847 (15) 739 (75) 713 (20) 695 (100) 587 (5) 577 (35) 575 (20) 451 (5) 425 (5) 423 (10) 407 (20) 405 (7) 287 (20)	220 (100) 280 (10)	Piccinelli et al. (2016)[313]
13	(епи)афзелехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**8.75**	849.3	831 (30) 723 (100) 697 (30) 695 (30) 679 (10) 577 (90) 571 (30) 559 (80) 541 (5) 517 (5) 451 (20) 433 (15) 425 (20) 407 (15) 3987 (10) 379 (5) 289 (10) 287 (10) 245 (2)	220 (100) 280 (10)	Dias et al. (2015)[315]
14	дигалоил-HHDP-хексоза [б]	**9.04**	*н.д.*	785.2	633 (30) 615 (15) 483 (75) 419 (15) 313 (15) 301 (100) 275 (15) 249 (15)	223 (100) 278 (30)	*Barros et al. (2013)*[63] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
15	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**9.35**	865.4	847 (15) 739 (40) 713 (15) 695 (100) 587 (15) 577 (35) 575 (20) 573 (10) 451 (10) 449 (12) 425 (12) 423 (10) 407 (10) 405 (7) 289 (2) 287	220 (100) 280 (15)	Piccinelli et al. (2016) [313]

					(10)		
16	(епи)афзелехин-(епи)катехин [б]	**9.44**	*н.д.*	561.2	543 (97) 435 (100) 425 (20) 407 (20) 381 (5) 329 (7) 289 (85)271 (15)	223 (100) 279 (10)	De Souza et al. (2008)[314] Dias et al. (2015)[315]
17	ругозин Б [б]	**10.49**	*н.д.*	953.2	909 (100) 883 (1) 785 (5)	*н.а.* (у траговима)	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
18	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин-галат [б]	*н.д.*	**10.87**	1017.3	999 (35) 891 (30) 865 (35) 847 (50) 829 (15) 739 (20) 729 (100) 727 (20) 695 (25) 677 (20) 603 (10) 577 (15) 575 (25) 559 (15) 543 (10) 525 (7) 439 (7) 407 (10) 287 (3)	220 (100) 270 (20)	Piccinelli et al. (2016)[313]
19	гаултерин [б]	**11.0**	**11.0**	491 $[M-H+FA]^-$	445 (10) 293 (100)	197 (100) 228 (60) 288 (10)	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
20	(епи)афзелехин-(епи)афзелехин-(епи)катехин [б]	**11.29**	*н.д.*	833.4	815 (10) 707 (50) 561 (50) 543 (100) 435 (7) 289 (15) 271 (10)	223 (100) 284 (15) 313 (10 sh)	De Souza et al. (2008)[314] Dias et al. (2015)[315]
21	дигалоил-HHDP-хексоза [б]	**12.11**	*н.д.*	785.3	633 (5) 615 (35) 483 (15) 419 (35) 301 (100) 275 (25) 249 (30)	223 (100) 301 (20) 327 (25)	*Barros et al. (2013)*[63]
22	(епи)катехин-(епи)катехин-галат [б]	**12.77**	*н.д.*	729.2	577 (100) 559 (45) 425 (25) 407 (35) 289 (5) 287 (7)	223 (100) 279 (15)	Piccinelli et al .(2016)[313] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
23	(епи)катехин-(епи)катехин-галат [б]	**13.23**	**13.36**	729.2	577 (100) 559 (40) 451 (5) 449 (7) 425 (25) 407 (40) 289 (2) 287 (5)	223 (100) 285 (15) 300 (10)	Piccinelli et al. (2016)[313]
24	галоил-бис-HHDP-хексоза [б]	*н.д.*	**14.24**	935.2	783 (2) 765 (2) 633 (100) 463 (5) 301 (30)	223 (100) 281sh (10)	García-Villalba et al. (2015)[316] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
25	(епи)афзелехин-(епи)афзелехин-	**15.65**	*н.д.*	833.4	815 (20) 707 (55) 561 (50) 543 (100) 435 (10) 289 (20)	*н.а.* (у	De Souza et al. (2008)[314] Dias et al. (2015)[315]

	(епи)катехин [б]				271 (5)	траговима)	
26	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин-галат [б]	*н.д.*	**16.79**	1017.3	999 (70) 891 (80) 865 (20) 847 (100) 829 (10) 771 (5) 739 (20) 729 (35) 727 (5) 695 (40) 677 (35) 603 (5) 577 (10) 575 (15) 559 (10) 557 (15) 543 (5) 525 (3) 449 (10) 439 (5) 407 (5) 387 (5)	*н.а.* (у траговима)	Piccinelli et al. (2016)[313]
27	(епи)катехин-(епи)катехин-галат [б]	*н.д.*	**17.29**	729.3	603 (10) 577 (100) 559 (30) 451 (10) 425 (20) 407 (40) 289 (5) 287 (7) 269 (1)	223 (100) 279 (5)	Piccinelli et al. (2016)[313]
28	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**17.43**	865.2	847 (5) 779 (7) 739 (65) 713 (65) 695 (100) 587 (65) 577 (25) 561 (45) 543 (50) 525 (15) 451 (35) 435 (5) 425 (50) 407 (40) 299 (5) 289 (2) 287 (5)	224 (100) 277 (5)	Piccinelli et al. (2016)[313]
29	тригалоил-HHDP-хексоза [б]	**18.76**	*н.д.*	937.3	893 (15) 785 (35) 767 (100) 741 (45) 465 (60) 419 (20) 313 (10) 301(70)	222 (100) 271 (40) 366 (5)	*Barros et al. (2013)*[63] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
30	елагинска киселина-O-пентозид [б]	*н.д.*	**19.02**	433.3	301 (100) 271 (5); 253 (2) 227 (1)	223 (100) 258 sh (30) 362 (5)	García-Villalba et al. (2015)[316]
31	(епи)афзелехин-(епи)катехин-галат [б]	*н.д.*	**19.13**	713.2	587 (10) 561 (70) 543 (100) 525 (10) 435 (5) 423 (25) 391 (5) 289 (3) 271 (2)	223 (100) 279 (15)	De Souza et al. (2008)[314]
32	(епи)афзелехин-(епи)катехин-галат [б]	*н.д.*	**19.61**	713.2	587 (10) 561 (65) 543 (100) 525 (5) 435 (5) 423 (25) 391 (7) 289 (7) 271 (2)	224 (100) 280 (5)	De Souza et al. (2008)[314]
33	хиперозид [а]	**20.40**	*н.д.*	463.2	301 (100)	223 (100) 270 (15) 355 (10)	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]

34	кверцетин-О-хексуронид [б] (миквелианин?)	**20.74**	*н.д.*	477.1	301 (100)	223 (100) 258 (45) 293 (20) 353 (40)	*Barros et al. (2013)*[63] *Bittjebier et al. (2016)*[58]
35	кверцетин-О-хексуронид [б]	**21.23**	*н.д.*	477.1	301 (100)	223 (100) 258 (45) 293 (20) 353 (40)	*Barros et al. (2013)*[63]
36	рутин [а]	**21.49**	*н.д.*	609.2	301 (100)	*н.а.* (смеша)	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
37	галоил-бис-HHDP-хексоза [б]	*н.д.*	**21.51**	935.2	917 (5) 633 (100) 463 (5) 301 (45)	223 (100) 280sh (10)	García-Villalba et al. (2015)[316]
38	ругозин А [б]	**21.55**	*н.д.*	1105.3	1061 (100) 937 (5) 935 (10) 917 (3)	*н.а.* (смеша)	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
39	изокверцитрин [а]	**21.55**	*н.д.*	463.3	301 (100)	*н.а.* (смеша)	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
40	димерни елагитанин (ругозин Е?) [б]	**22.26**	*н.д.*	860.4 $[M-2H]^{2-}$; 1721.3 $[M-H]^{-}$	937 (65) 917 (80) 909 (25) 891 (5) 785 (100) 775 (30) 765 (55) 699 (15) 605 (7) 483 (5) 301 (5)	223 (100) 282 (20)	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
41	кверцетин-О-пентозид [б]	**23.04**	*н.д.*	433.3	301 (100)	*н.а.* (у траговима)	*Barros et al. (2013)*[63] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
42	кверцетин-галоил-хексоза [б]	**24.00**	*н.д.*	615.3	463 (5) 301 (100)	*н.а.* (у траговима)	Pukalskienė et al. (2015)[87] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
43	кверцетин-галоил-хексоза [б]	**24.60**	*н.д.*	615.3	463 (5) 301 (100)	223 (100) 268 (20) 359 (15)	Pukalskienė et al. (2015)[87] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
44	димерни елагитанин (аргимонин?) [б]	*н.д.*	**26.09**	934.6 $[M-2H]^{2-}$; 1869.3 $[M-H]^{-}$	1567 (100) 1265 (25) 1085 (25) 915 (60) 897 (60) 784 (35) 633 (80) 463 (5) 301 (100)	224 (100) 270 (10)	Moilanen et al. (2015)[317]

45	монометил-тетрагалоил-HHDP-хексоза (ругозин A-монометилетар?) [б]	**26.51**	*н.д.*	1119.2	937 (100) 917 (75)	*н.а.* (смеша)	*Nitta et al. (2013)*[64]
46	спиреозид [а]	**26.55**	*н.д.*	463.2	301 (100)	*н.а.* (смеша)	референтно једињење *Krasnov et al. (2006)*[52]
47	кверцитрин [а]	**26.64**	**26.59**	447.3	301 (100) 285 (15)	*н.а.* (смеша)	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
48	кемпферол-хексозид [б]	**27.41**	*н.д.*	447.2	285 (100)	336 (100) 268 (15) 369 (5)	Pukalskienė et al. (2015)[87] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
49	димерни елагитанин (ругозин Д?) [б]	**28.21**	*н.д.*	936.4 $[M-2H]^{2-}$; 1873.3 $[M-H]^{-}$	1061 (20) 917 (100) 860 (40) 851 (45) 767 (100) 465 (15) 301 (20)	223 (100) 279 (20)	Pukalskienė et al. (2015)[87] *Bijttebier et al. (2016)*[58]

[а] условно идентификовано на основу масе и литературних података фрагментације, постојање структурних изомера се не може искључити;
[б] недвосмислено идентификовано коришћењем аутентичног референтног једињења;
[в] Релативна заступљеност у заградама;
[г] Релативна заступљеност у заградама;
[д] *Искошена слова* – литература која описује идентификацију једињења у *F. ulmaria,* неискошена слова – литература која описује идентификацију једињења у другом биљном материјалу;
н.д. – није детектовано; *н.а.* – није анализирано.

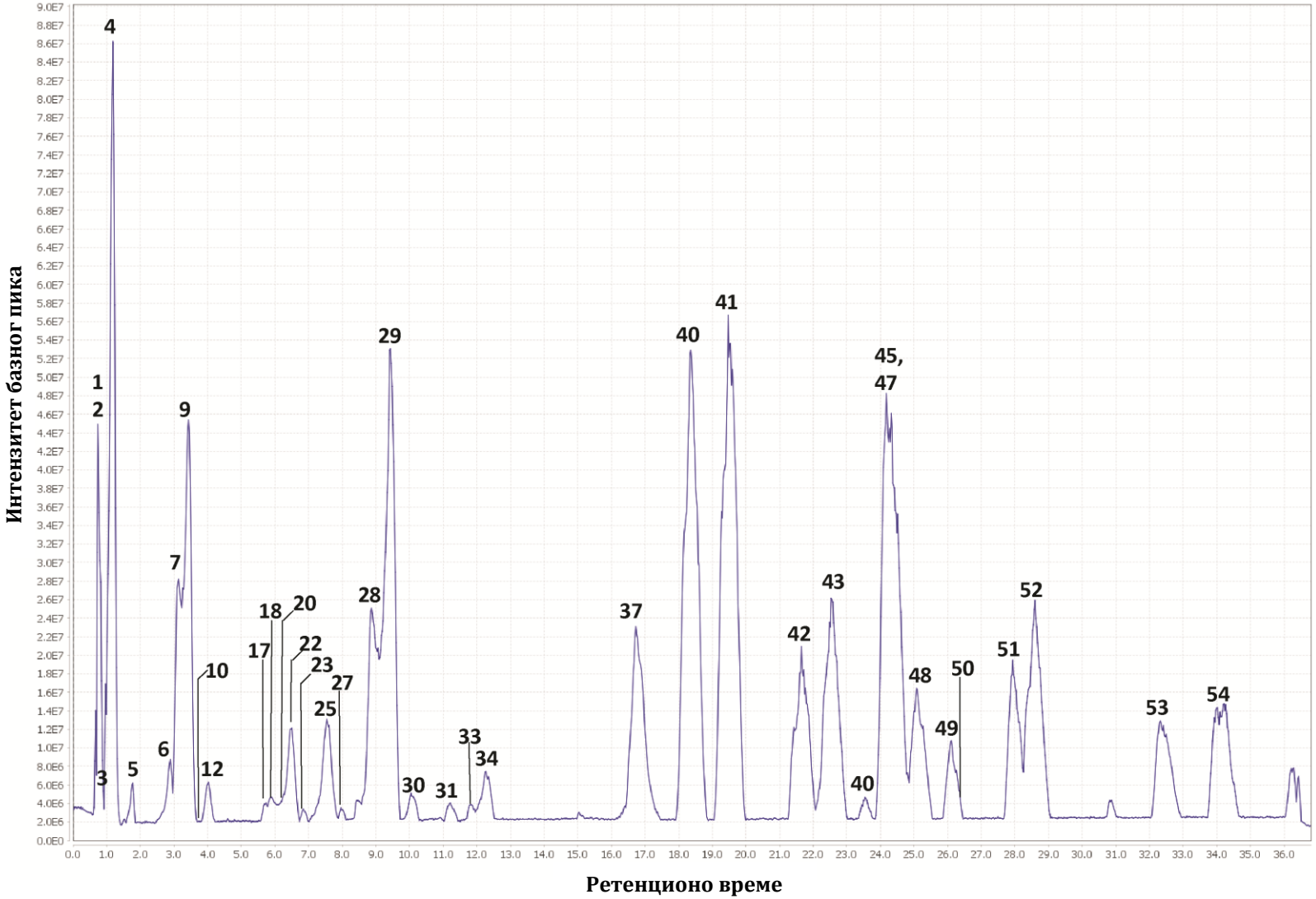
Како је при LC-DAD-MS^n анализи екстраката биљке *F. hexapetala* хроматографско раздвајање и идентификовање пикова било изузетно отежано због преклапања пикова различитих једињења, за анализу ових екстраката (FHA и FHR) примењена је течна хроматографија са масеном спектрометријом високе резолуције (LC-DAD-HRMS), где је инструмент за течну хроматографију Ultimate 3000 UHPLC-DAD (Thermo Scientific, Бремен, Немачка) повезан са масеним спектрометром високе резолуције QExactive HR mass spectrometer (Thermo Scientific, Бремен, Немачка). Ради боље прегледности, добијени хроматограми за оба екстракта су приказани на одвојеним сликама, хроматограм FHA на *Слици 5.6.* и хроматограм FHR на *Слици 5.7.*, док су остали параметри дати у *Табели 5.4*. Бројеви који се у тексту односе на идентификована једињења у екстрактима *F. hexapetala* дефинишу редом једињења у поменутој *Табели 5.4.* и датим хроматограмима. Пикови су, као и у претходном случају, идентификовани поређењем резултата хроматографске анализе са аутентичним референтним једињењима или је идентификација базирана на коришћењу доступне научне литературе где су дати хроматографски подаци за фенолна једињења присутна у екстрактима конкретне биљке, биљака из рода *Filipendula* или појединачних фенолних једињења у неком другом биљном материјалу. Такође, за идентификацију полифенолних једињења коришћене су и базе података доступне на интернету, и то најпре „Metlin“ (http://www.metlin.scripps.edu/) и „HMDB“ (http://www.hmdb.ca/).

Резултати LC-DAD-HRMS анализе потврдили су присуство истих група фенолних једињења у екстрактима биљке *F. hexapetala* као што је то био случај и са екстрактима *F. ulmaria*. Дакле, FHA и FHR екстракти садрже три велике групе фенолних једињења, и то флавоноиде и њихове деривате, хидролизабилне танине и процијанидине тј. кондензоване танине, али поред њих идентификоване су фенолне киселине и њихови деривати.

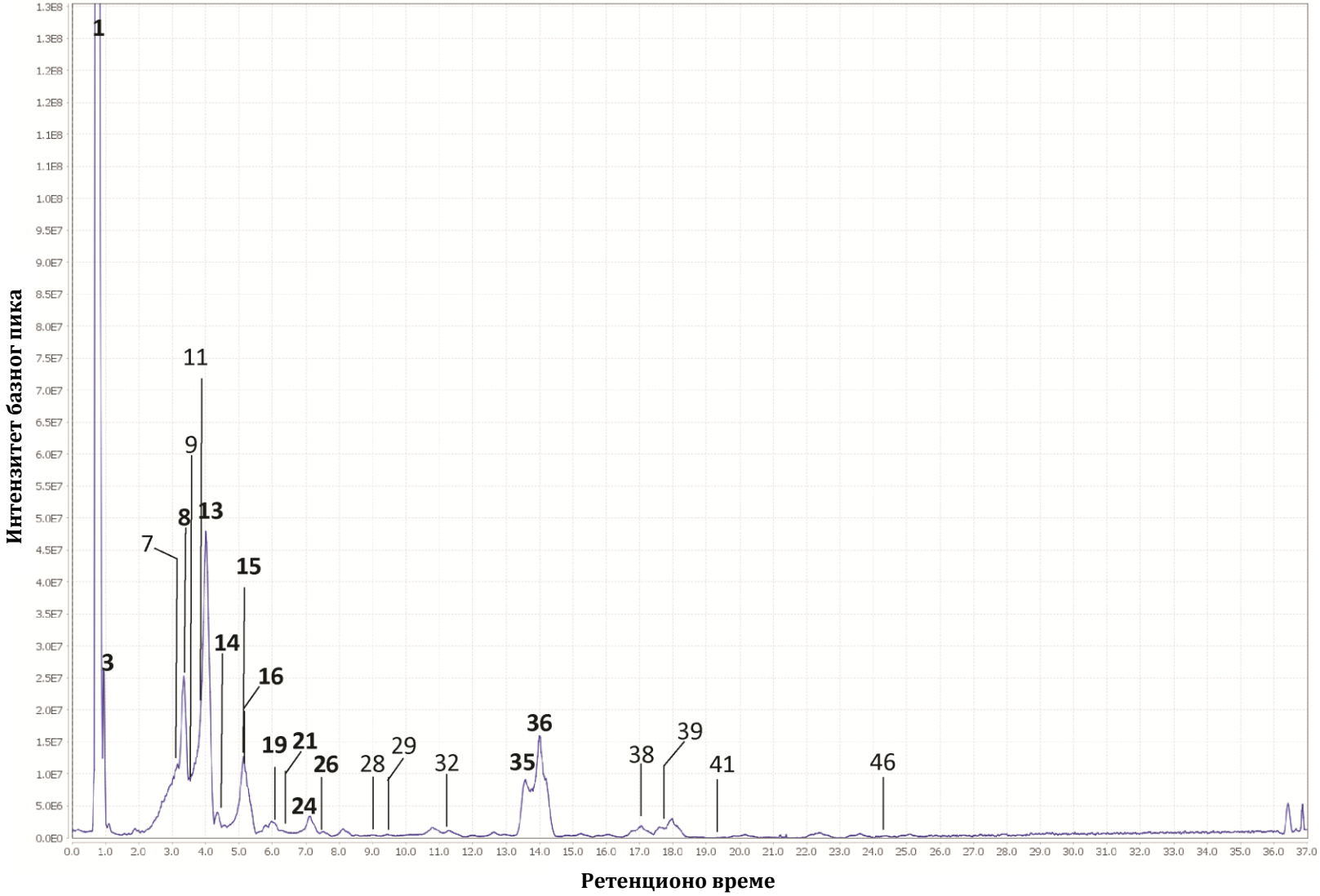
За разлику од екстраката *F. ulmaria*, у FHA и FHR екстрактима идентификована је сахароза (**1**), која је изузетно заступљена у екстракту корена што се може видети по израженом интензитету пика **1** на *Слици 5.7*. Од органских киселина у оба биљна органа идентификована је лимунска киселина (**3**). Гална киселина (**4**) била присутна само у надземном делу док су њени метил деривати (**7** и **9**) идентификовани у оба екстракта, при чему су у корену присутни у траговима. У случају екстраката биљке *F. hexapetala* забележено је присуство деривата кафеинске киселине са другим киселинама или угљеним хидратима (**6**, **18**, **20**, **22**, **23**, **27**, **33**, **34**, **52** и **54**), којих нема у екстрактима друге испитиване биљке, а који су органичени само на екстракт надземног дела (FHA). Присуство још једне фенолне киселине, која је од изузетног значаја за овај род биљака, али није идентификована у *F. ulmaria* екстрактима, салицилне киселине (**31**) забележено је у екстракту FHA. Такође, у оба екстракта *F. hexapetala* детектован је и дериват салицилне киселине гаултерин, и то у изомерним облицима (**28** и **29**). Концентрација гаултерина у екстрактима је знатно виша у надземном делу него што је то случај са кореном, што је била карактеристика и код LC-MS анализе претходне биљне врсте.

Процијанидини у облику димера, тримера и тетрамера су идентификовани и у екстрактима биљке *F. hexapetala*, при чему су галоиловани процијанидини, и то дигалоил хексозиди (**2** и **5**) и тригалоил хексозид (**17**) присутни само у FHA екстракту. С друге стране, присуство процијанидина који се састоје од остатака (епи)катехина и (епи)афзелехина (једињења **8**, **11**, **14**, **15**, **16**, **19**, **21**, **24, 26** и **32**) ограничено је само на екстракт корена ове биљке. Такође, у FHA екстракту детектовани су хидролизабилни танини који садрже остатке галоилованих хексахидрокси-дифенил (HHDP) хексоза – дигалоил-HHDP-хексозе (**10**, **12**, **25**, **30**) и тригалоил-HHDP-хексоза (**37**), што је заједничка карактеристика надземних делова обе испитиване биљке. Епикатехин није идентификован у биљним деловима *F. hexapetala*, а мономерни катехин (**13**) је био присутан само у FHR екстракту. Као што је био случај са претходном биљном врстом, ни код екстраката *F. hexapetala* није идентификована елагинска киселина, али је у екстракту корена у траговима детектован дериват елагинска киселина-*O*-пентозид (**38** и **39**) и димерни елагитанин, за који се претпоставља да је ругозин Д (**50**), у екстракту надземног дела.

Што се тиче флавоноида и њихових деривата, они су углавном идентификовани у надземном делу биљке *F. hexapetala*, уз неколико изузетака заступљених само у корену. Кверцетин (**53**) је у основном облику идентификован само у FHA екстракту заједно са својим галоил и метил дериватима (**42**, **43**, **44** и **49**), док је присуство метилкверцетин-пентозида (**46**) забележено у траговима у FHR. Остали деривати кверцетина присутни у облику флавоноидних гликозида, хиперозид (**40**), спиреозид (**47**) и кверцитрин (**48**), детектовани су искључиво у FHA екстракту. Изокверцитрин (**41**) је у значајној количини присутан у надземном делу биљке *F. hexapetala*, док је у екстракту корена детектован у траговима. Рутин није идентификован ни у једном екстракту *F. hexapetala*. Поред деривата кверцетина, забележено је присуство деривата флавоноида кемпферола, и то кемпферол-хексозида (**45**, највероватније астрагалин) и кемпферол-галоил-хексозида (**51**), оба у надземном делу биљке, као и присуство аромадендрин хексозида (**35** и **36**), који представља хексозид дихидрокемпферола, у корену биљке *F. hexapetala*.



Слика 5.6. LC-HRMS хроматограм метанолног екстракта надземног дела биљке F. hexapetala (FHA).
Пикови су идентификовани на основу аутентичних референтних једињења или литературних података.



Слика 5.7. LC-HRMS хроматограм метанолног екстракта корена биљке F. hexapetala (FHR).
Пикови су идентификовани на основу аутентичних референтних једињења или литературних података.

Табела 5.4. Једињења идентификована помоћу LC-DAD-HRMS анализе у екстрактима F. hexapetala (FHA и FHR). Пикови су идентификовани поређењем са аутентичним референтним једињењима[а] или базирано на коришћењу литературних података[б]

Број	Једињење	FHA Rt (min)	FHR Rt (min)	ESI-full MS (m/z)	MS^2 фрагменти (m/z)[в]	Маса моно-изотопа	Молекулска формула	Δ (ppm)	Референца за идентификацију
1	сахароза [а]	**0.73**	**0.73**	341.1088 $[M-H]^-$ 377.0856 $[M+^{35}Cl]^-$ (BP) 379.0821 $[M+^{37}Cl]^-$ 387.1145 $[M+HCOO]^-$	377 (70) 341 (100) 215 (20) 179 (30) 161 (10) 119 (30) 113 (20) 101 (20) 89 (75) 71 (25) 589 (30)	342.1167	$C_{12}H_{22}O_{11}$	2.97	референтно једињење
2	дигалоил-хексозид [б]	**0.75**	*н.д.*	483.0782 $[M-H]^-$	483 (30) 331 (10) 313 (15) 301 (5) 271 (5) 211 (5) 169 (100) 151 (5) 125 (40)	484.0681	$C_{20}H_{20}O_{14}$	2.61	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
3	лимунска киселина [а]	**0.96**	**0.94**	191.0188 $[M-H]^-$	191 (10) 129 (5) 111 (100) 87 (50) 85 (35)	192.0267	$C_6H_8O_7$	0.74	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
4	гална киселина [а]	**1.19**	*н.д.*	169.013 $[M-H]^-$	169 (40) 125 (100)	170.0209	$C_7H_6O_5$	-0.59	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
5	дигалоил-хексозид [б]	**1.77**	*н.д.*	483.0782 $[M-H]^-$	483 (30) 331 (10) 313 (15) 301 (5) 271 (5) 211 (5) 169 (100) 151 (5) 125 (40)	484.0681	$C_{20}H_{20}O_{14}$	2.61	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
6	кафеоил-оксалацетил хексозид [б]	**2.89**	*н.д.*	455.0809 $[M-H]^-$ 341.0877 $[M-H-C_4H_2O_4]^-$	341 (20) 179 (20) 161 (75) 131 (15) 113 (100) 67 (70)	456.0888	$C_{19}H_{20}O_{13}$	-2.45	Álvarez-Fernández et al. (2015)[318]

7	метил галат [а]	**3.13**	3.11 (трагови)	183.0289 $[M-H]^-$	183 (100) 168 (20) 124 (35)	184.0368	$C_8H_8O_5$	0.22	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
8	(епи)катехин-(епи)катехин-дихексозид [б]	*н.д.*	**3.30**	901.2413 $[M-H]^-$ 739.1885 [M-H-хексоза]$^-$ 577.1353 [M-H-2х хексоза]$^-$ 451.1247 BP [M-H-катехин-хексоза]$^-$ 289.0717 катехин]$^-$	901 (30) 721 (15) 587 (30) 569 (35) 451 (50) 407 (15) 389 (25) 289 (10) 281 (15) 269 (85) 255 (40) 243 (40) 229 (15) 225 (15) 217 (10) 187 (15) 175 (15) 151 (40) 137 (100) 125 (75) 109 (10)	902.2492	$C_{42}H_{46}O_{22}$	1.68	Ojwang et al. (2013)[319] Metlin
9	метил галат изомер [б]	**3.43**	3.42 (трагови)	183.0289 $[M-H]^-$	183 (100) 168 (20) 153 (10) 139 (15) 124 (20) 111 (5) 97 (5) 62 (10)	184.0368	$C_8H_8O_5$	0.22	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
10	дигалоил-HHDP-хексоза [б]	**3.73**	*н.д.*	785.0849 $[M-H]^-$	785 (25) 633 (3) 419 (3) 301 (100) 275 (45) 249 (35) 169 (15) 125 (10)	786.0928	$C_{34}H_{26}O_{22}$	2.01	*Barros et al. (2013)*[63]
11	(епи)катехин-(епи)-катехин [б]	*н.д.*	**3.84**	577.1353 $[M-H]^-$	577 (10) 451 (10) 407 (70) 339 (10) 289 (70) 256 (10) 245 (20) 229 (5) 205 (15) 175 (10) 161 (25) 151 (15) 137 (25) 125 (100) 109 (15)	578.1432	$C_{30}H_{26}O_{12}$	1.87	*Bijttebier et al. (2016)*[58] Metlin
12	дигалоил-HHDP-хексоза [б]	**4.0**	*н.д.*	785.0848 $[M-H]^-$	785 (25) 633 (3) 615 (3) 419 (3) 301 (100) 275 (45) 249 (35) 231 (10) 169	786.0927	$C_{34}H_{26}O_{22}$	2.01	*Barros et al. (2013)*[63]

					(10) 125 (5)				
13	катехин [а]	*н.д.*	**4.0**	289.0719 $[M-H]^-$	289 (100) 245 (50) 221 (15) 205 (25) 203 (40) 187 (10) 179 (20) 161 (15) 151 (30) 137 (25) 125 (50) 123 (35) 109 (60) 97 (20) 95 (15)	290.0258	$C_{15}H_{14}O_6$	4.27	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
14	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**4.5**	865.1993 $[M-H]^-$	865 (5) 739 (10) 577 (10) 525 (10) 407 (30) 289 (30) 287 (25) 243 (35) 217 (20) 177 (10) 175 (15) 161 (30) 151 (15) 137 (15) 125 (100)	866.2017	$C_{45}H_{38}O_{18}$	2.13	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
15	(епи)афзелехин-(епи)катехин-хексозид [б]	*н.д.*	**5.1**	723.1940 $[M-H]^-$	723 (10) 597 (5) 543 (10) 525 (20) 435 (5) 433 (5) 419 (10) 417 (5) 407 (30) 289 (100) 271 (15) 253 (25) 245 (30) 205 (15) 203 (15) 164 (20) 151 (15) 137 (25) 125 (35) 109 (20)	724.2019	$C_{36}H_{36}O_{16}$	2.86	Ojwang et al. (2013)[319]
16	(епи)афзелехин-(епи)катехин-дихексозид [б]	*н.д.*	**5.3**	885.2469	885 (20) 759 (5) 569 (5) 525 (5) 451 (40) 433 (5) 391 (5) 379 (5) 293 (10) 289 (5) 271 (20) 253 (30) 243 (10) 229 (5) 164 (5) 151 (30) 137 (100) 125 (60)	886.2548	$C_{42}H_{46}O_{21}$	2.45	Ojwang et al. (2013)[319]

17	тригалоил-хексоза [б]	**5.7**	*н.д.*	635.0897 $[M-H]^-$	635 (10) 465 (30) 313 (50) 169 (100) 125 (30)	636.0976	$C_{27}H_{24}O_{18}$	2.88	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
18	кафеоилтреонска киселина [б]	**5.91**	*н.д.*	297.0615 $[M-H]^-$	179 (10) 161 (5) 135 (100) 117 (5) 99 (11) 89 (5) 75 (20) 73 (3)	298.0694	$C_{13}H_{14}O_8$	3.45	Kuczkowiak et al. (2014)[320] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
19	(епи)афзелехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**6.0**	561.1405 $[M-H]^-$	561 (10) 435 (15) 407 (30) 329 (5) 289 (100) 273 (25) 269 (15) 245 (35) 205 (15) 203 (25) 164 (30) 151 (10) 137 (30) 125(75) 109 25) 83 (5)	562.1124	$C_{30}H_{26}O_{11}$	2.43	De Souza et al. (2008)[314]
20	Кафеоилглицеринска киселина [б]	**6.38**	*н.д.*	267.0510 $[M-H]^-$	179 (5) 161 (40) 135 (5) 105 (100)	268.0589	$C_{12}H_{12}O_7$	4.12	Hahn и Nahrstedt (1993)[321]; Metlin
21	(епи)афзелехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**6.4**	849.2045 $[M-H]^-$	559 (20) 539 (5) 407 (40) 289 (55) 271 (10) 245 (25) 203 (5) 175 (5) 164 (50) 161 (30) 137 (25) 125 (100)	850.2124	$C_{45}H_{38}O_{17}$	2.36	De Souza et al. (2008)[314] Dias et al. (2015)[315]
22	кафеоилтреонска киселина [б]	**6.48**	*н.д.*	297.0615 $[M-H]^-$	179 (10) 161 (5) 135 (100) 117 (3) 89 (5) 75 (20)	298.0694	$C_{13}H_{14}O_8$	3.45	Kuczkowiak et al. (2014)[320] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
23	Кафеоилглицеринска киселина [б]	**6.85**	*н.д.*	267.0510 $[M-H]^-$	179 (5) 161 (45) 135 (10) 105 (100)	268.0589	$C_{12}H_{12}O_7$	4.12	Hahn and Nahrstedt (1993)[321]; Metlin
24	(епи)афзелехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**7.2**	849.2043 $[M-H]^-$	577 (5) 559 (5) 451 (5) 407 (25) 371 (5) 289 (45) 271 15) 245 (5) 203) 5) 164	850.2122	$C_{45}H_{38}O_{17}$	2.15	De Souza et al. (2008)[314] Dias et al. (2015)[315]

					(15) 161 (20) 151 (5) 137 (25) 125 (100)				
25	дигалоил-HHDP-хексоза [б]	**7.5**	*н.д.*	785.0848 $[M-H]^-$	785 (20) 615 (3) 483 (3) 419 (3) 301 (100) 275 (45) 249 (30) 231 (10) 169 (15) 125 (10	786.0927	$C_{34}H_{26}O_{22}$	2.09	*Barros et al. (2013)*[63]
26	(епи)катехин-(епи)катехин-(епи)катехин [б]	*н.д.*	**7.6**	865.1993 $[M-H]^-$	695 (10) 575 (5) 525 (5) 407 (25) 289 (30) 287 (25) 261 (15) 243 (35) 217 (15) 177 (10) 175 (10) 165 (5) 161 (35) 151 (15) 137 (5) 125 (100) 109 (5)	866.2017	$C_{45}H_{38}O_{18}$	2.20	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
27	кафеоил-хидроксиглутарна киселина [б]	**7.96**	*н.д.*	309.0617	309 (35) 179 (90) 161 (95) 135 (100) 129 (30)	310.0696	$C_{14}H_{14}O_8$	4.03	Lorenz et al. (2012)[322]
28	гаултерин/ изомер [б]	**8.87**	**8.90**	491.1407 $[M+HCOO]^-$	293 (35) 233 (5) 191 (5) 151 (100) 131 (10) 125 (20) 101 (10) 89 (70) 71 (50) 59 (35)	446.1432	$C_{19}H_{26}O_{12}$	2.69	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
29	гаултерин/ изомер [б]	**9.41**	**9.42**	491.1406 $[M+HCOO]^-$	293 (30) 233 (5) 191 (5) 151 (100) 131 (10) 125 (20) 113 (5) 101 (10) 89 (70) 71 (50) 59 (30)	446.1431	$C_{19}H_{26}O_{12}$	2.62	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
30	дигалоил-HHDP-хексоза [б]	**10.40**	*н.д.*	785.0851 $[M-H]^-$	785 (15) 615 (5) 419 (3) 301 (100) 275 (25) 249 (15) 169 (10) 125 (5)	786.0930	$C_{34}H_{26}O_{22}$	2.47	*Barros et al. (2013)*[63]

31	салицилна киселина [а]	**11.20**	*н.д.*	137.0230 $[M-H]^-$	137 (40) 93 (100)	138.0309	$C_7H_6O_3$	-2.05	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
32	(епи)катехин-(епи)катехин галат [б]	*н.д.*	11.3 (трагови)	729.1472 $[M-H]^-$	729 (5) 577 (20) 559 (15) 473 (5) 451 (5) 425 (5) 407 (45) 329 (25) 289 (45) 269 (35) 245 (5) 187 (5) 169 (35) 161 (20) 137 (15) 125 (100) 109 (15)	730.1551	$C_{37}H_{30}O_{16}$	2.20	Piccinelli et al (2016)[313] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
33	кафеоил пентозид [б]	**11.90**	*н.д.*	311.0773 $[M-H]^-$	311 (40) 254 (5) 221 (15) 179 (35) 161 (100) 135 (70) 89 (10)	312.0853	$C_{14}H_{16}O_8$	4.10	Metlin
34	кафеоил пентозид [б]	**12.25**	*н.д.*	311.0772 $[M-H]^-$	311 (40) 221 (10) 179 (40) 161 (100) 135 (70) 89 (10) 59 (10)	312.0851	$C_{14}H_{16}O_8$	3.33	Metlin
35	аромадендрин хексозид [б]	*н.д.*	**13.58**	449.1092 $[M-H]^-$	449 (40) 287 (3) 286 (5) 269 (100) 259 (10) 225 (225 (5) 179 (35) 151 (60) 135 (5) 125 (10) 107 (20)	450.1171	$C_{21}H_{22}O_{11}$	2.94	Alvarez-Fernandez et al. (2016)[323]; HMDB
36	аромадендрин хексозид [б]	*н.д.*	**14.00**	449.1091 $[M-H]^-$	449 (40) 287 (3) 286 (5) 269 (100) 259 (10) 225 (225 (5) 179 (35) 151 (55) 135 (5) 125 (10) 107 (15)	450.1170	$C_{21}H_{22}O_{11}$	2.74	Alvarez-Fernandez et al. (2016)[323]; HMDB

37	тригалоил-HHDP-хексоза [б]	**16.7**	*н.д.*	937.0958 $[M-H]^-$ 468.0438 $[M-2H]^{2-}$ 300.9989	937 (25) 767 (5) 599 (3) 465 (5) 419 (3) 301 (100) 275 (25) 249 (15) 169 (20) 125 (7)	938.1037	$C_{41}H_{30}O_{26}$	1.13	*Barros et al. (2013)*[63] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
38	елагинска киселина-O-пентозид [б]	*н.д.*	17.05 (трагови)	433.0416	433 (40) 301 (100) 299 (50) 271 (3) 257 (3)	434.0495	$C_{19}H_{14}O_{12}$	3.25	García-Villalba et al. (2015)[316]
39	елагинска киселина-O-пентозид [б]	*н.д.*	17.87 (трагови)	433.0415 $[M-H]^-$	433 (35) 301 (95) 299 (100)	434.0494	$C_{19}H_{14}O_{12}$	3.11	García-Villalba et al. (2015)[316]
40	хиперозид [а]	**18.40**	*н.д.*	463.0883	463 (30) 301 (45) 300 (100) 271 (25) 255 (10) 243 (3) 179 (5) 151 (5)	464.0962	$C_{21}H_{20}O_{12}$	2.57	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*
41	изокверцитрин [а]	**19.50**	19.49 (трагови)	463.0883 $[M-H]^-$	463 (30) 301 (45) 300 (100) 271 (25) 255 (15) 243 (3) 179 (5) 151 (10)	464.0962	$C_{21}H_{20}O_{12}$	2.57	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
42	кверцетин-галоил-хексоза [б]	**21.59**	*н.д.*	615.0991 $[M-H]^-$	615 (3) 463 (3) 301 (100) 273 (3) 229 (3) 179 (25) 151 (35) 121 (10)	616.1070	$C_{28}H_{24}O_{16}$	1.72	*Pukalskienė et al. (2015)*[119] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
43	кверцетин-галоил-хексоза [б]	**22.54**	*н.д.*	615.0990 $[M-H]^-$	615 (5) 463 (3) 301 (100) 273 (3) 179 (30) 151 (40) 121 (10)	616.1069	$C_{28}H_{24}O_{16}$	1.53	*Pukalskienė et al. (2015)*[119] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
44	метилкверцетин-хексозид [б]	**23.54**	*н.д.*	477.1039 $[M-H]^-$	477 (20) 462 (5) 315 (20) 314 (35) 300 (30) 299 (100) 271 (30) 255 (10)	478.1118	$C_{22}H_{22}O_{12}$	1.19	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
45	кемпферол-хексозид (астрагалин?) [б]	**24.2**	*н.д.*	447.0933 $[M-H]^-$	447 (45) 285 (40) 284 (100) 255 (50) 227 (25)	448.1012	$C_{21}H_{20}O_{11}$	2.53	*Pukalskienė et al. (2015)*[119] *Bijttebier et al.*

									(2016)[58]
46	метилкверцетин-пентозид [б]	*н.д.*	24.29 (трагови)	447.0575 $[M-H]^-$	447 (30) 315 (100) 299 (85) 284 (20) 255 (10) 227 (3) 209 (3)	448.0654	$C_{20}H_{16}O_{12}$	3.80	Metlin
47	спиреозид [а]	**24.30**	*н.д.*	463.0884 $[M-H]^-$	463 (5) 301 (100) 273 (5) 179 (30) 151 (45) 121 (10) 107 (5)	464.0963	$C_{21}H_{20}O_{12}$	2.82	референтно једињење *Krasnov et al. (2006)*[52]
48	кверцитрин [а]	**25.04**	*н.д.*	447.0935 $[M-H]^-$	447 (45) 285 (30) 284 (100) 151 (15)	448.1014	$C_{21}H_{20}O_{11}$	2.89	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
49	метилкверцетин-хексозид [б]	**26.16**	*н.д.*	477.1040 $[M-H]^-$	477 (85) 315 (15) 314 (100) 299 (15) 285 (30) 271 (40) 257 (15) 243 (40)	478.1119	$C_{22}H_{22}O_{12}$	2.55	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
50	димерни елагитанин (ругозин Д?) [б]	**26.43**	*н.д.*	936.0889 $[M-2H]^{2-}$	1061 (5) 936 (30) 917 (15) 785 (10) 767 (15) 749 (10) 599 (3) 451 (10) 301 (100) 275 (20) 249 (10) 169 (20)	1874.1936	$C_{82}H_{58}O_{52}$	2.76	*Pukalskienė et al. (2015)*[119] *Bijttebier et al. (2016)*[58]
51	кемпферол-галоил-хексозид [б]	**27.90**	*н.д.*	599.1044 $[M-H]^-$	599 (3) 447 (3) 313 (10) 285 (100) 257 (15) 229 (10) 169 (5) 151 (10)	600.1123	$C_{28}H_{24}O_{15}$	2.04	*Bijttebier et al. (2016)*[58]
52	дикафеоил-хексозид [б]	**28.55**	*н.д.*	503.2733 $[M-H]^-$	503 (20) 341 (25) 323 (5) 281 (35) 251 (25) 221 (30) 179 (70) 161 (100) 135 (30)	504.2812	$C_{24}H_{24}O_{12}$	2.62	Metlin

53	кверцетин [а]	**32.17**	*н.д.*	301.0355 $[M-H]^-$	301 (75) 273 (10) 245 (5) 229 (5) 193 (3) 179 (45) 151 (95) 121 (30) 107 (25)	302.0434	$C_{15}H_{10}O_7$	3.92	референтно једињење *Bijttebier et al. (2016)*[58]
54	кафеоил-кумароил хексозид [б]	**34.00**	*н.д.*	487.1247 $[M-H]^-$	487 (20) 341 (30) 323 (35) 281 (50) 251 (30) 221 (35) 179 (100) 161 (35) 145 (50) 135 (45)	488.1326	$C_{24}H_{24}O_{11}$	2.47	Metlin

[а] условно идентификовано на основу масе и литературних података фрагментације, постојање структурних изомера се не може искључити;
[б] недвосмислено идентификовано коришћењем аутентичног референтног једињења;
[в] Релативна заступљеност у заградама; *н.д.* – није детектовано;
Искошена слова – литература која описује идентификацију компоненти у врстама из рода *Filipendula*; Metlin: metlin.scripps.edu/; HMDB: http://www.hmdb.ca/

II ФАРМАКОЛОШКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА

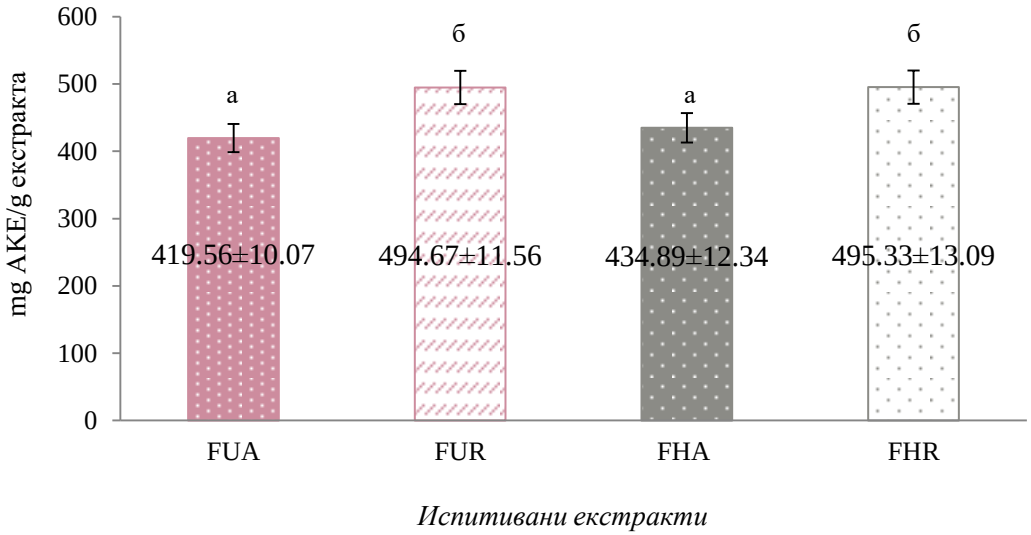
5.5. Антиоксидативна активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

5.5.1. Антиоксидативна активност на нивоу слободних радикала, хелатационог, редукционог и укупног антиоксидативног капацитета

Коришћењем једне или малог броја метода за испитивање антиоксидативне активности не може се добити јасан профил антиоксидативног деловања испитиване супстанце. Из тог разлога у употреби су бројни тестови којима се може одредити способност неутрализације различитих слободних радикала, капацитет хелатације, редукције или укупна антиоксидативна активност неког једињења, смеше једињења, природних или комерцијално доступних производа. У хемији природних производа начињени су многи кораци у процесу дефинисања и квантификације „антиоксидативног капацитета“. Термин „укупан антиоксидативни капацитет“ означава способност антиоксиданата присутних у испитиваном материјалу да оксидују супстрат (најчешће слободне радикале). Потребно је нагласити да су вредности укупног антиоксидативног капацитета мерене различитим методама, у најбољем случају, семиквантитативне и не разликују нужно реактивност од концентрације антиоксиданата. Битно је истаћи и да ови резултати често не корелирају са антиоксидативним потенцијалом или инхибицијом оксидације у *in vivo* условима.[324]

Укупан антиоксидативни капацитет (укупна антиоксидативна активност) испитиваних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* одређен је фосфор-молибденовом методом и изражен у еквивалентима аскорбинске киселине (mg AKE/g екстракта).[266] Резултати ове анализе, приказани на *Слици 5.8.*, указују на приближно сличне вредности за сва четири испитивана екстракта. Најслабији антиоксидативни капацитет испољио је екстракт надземног дела *F. ulmaria* (419.56 mg AKE/g), а потом следи екстракт надземног дела *F. hexapetala* са вредношћу (434.89 mg AKE/g) која се статистички значајно не разликује ($p > 0.05$) од претходно поменутог екстракта. Екстракти корена обе биљке (FUR и FHR) су, у односу на екстракте надземних делова, показали нешто виши и приближно једнак укупни антиоксидативни капацитет (494.67 mg AKE/g за FUR и 495.33 mg AKE/g за FHR, $p > 0.05$).

Како би се одредила антиоксидативна активност биљних екстраката, у употреби је велики број метода, али свака од њих има нека ограничења услед комплексне природе фитојединења присутних у екстрактима и њихове међусобне интеракције. Стога је значај испитивања антиоксидативне активности коришћењем више тестова и метода вишеструк.[325]



Слика 5.8. Укупан антиоксидативни капацитет екстраката биљака F. ulmaria и F. hexapetala, изражен у еквивалентима аскорбинске киселине (mg AKE/g екстракта).

Резултати су изражени као средња вредност три независна мерења ± С.Д. (n = 3). АКЕ – еквиваленти аскорбинске киселине. Вредности означене различитим словима се статистички значајно разликују на $p < 0.05$.

Због свеобухватније и прецизније евалуације антиоксидативног потенцијала испитиваних екстраката, поред већ наведеног теста, спроведен је већи број *in vitro* метода базираних на различитим механизмима антиоксидативног деловања. Способност екстраката да неутралишу слободне радикале и тиме инхибирају слободно-радикалске процесе испитивана је на нивоу DPPH$^{\cdot}$ радикала, ABTS$^{+\cdot}$ радикал-катјона, $O_2^{\cdot-}$ радикал-анјона и NO$^{\cdot}$ радикала. Најпоузданији и најприхватљивији начин изражавања антиоксидативне активности испитиваних узорака је кроз IC_{50} вредности. Ова вредност се дефинише као концентрација испитиваног узорка која инхибира штетно деловање слободних радикала за 50%, а изражава се у милиграмима по мililитру екстракта (μg/mL). Резултати антиоксидативне активности екстраката и стандардних природних и синтетичких антиоксиданата на нивоу слободних радикала приказани су у *Табели 5.5*. Битно је нагласити да ниже IC_{50} вредности указују на бољи антиоксидативни потенцијал испитиваног материјала.

Највиши степен антиоксидативног деловања на нивоу DPPH радикала показала је гална киселина, са IC_{50} вредношћу 2.08 μg/mL. Такође, изузетно добре антиоксидативне особине запажене су у случају аскорбинске и елагинске киселине. Што се тиче испитиваних екстраката, у DPPH$^{\cdot}$ тесту најбољу антиоксидативну активност испољио је FUR екстракт (IC_{50} 10.58 μg/mL), при чему се резултат статистички значајно не разликује ($p > 0.05$) од активности елагинске киселине (8.84 μg/mL). Екстракти надземног дела обе испитиване биљке имали су приближне IC_{50} вредности (16.41 μg/mL за FUA и 13.47 μg/mL за FHA) које нису статистички значајно различите ($p > 0.05$) у односу на кверцетин (17.49 μg/mL) и синтетички антиоксидант БХТ (20.86 μg/mL). У концентрацији од 26.27 μg/mL FHR екстракт је могао да инхибира 50% од

укупне количине DPPH радикала, што је приближно IC_{50} вредности ($p > 0.05$) добијеној за флавоноидни гликозид рутин (23.13 μg/mL).

Антирадикалска активност испитиваних екстраката на нивоу ABTS радикал-катјона била је приближно једнака ($p > 0.05$). Као и у случају DPPH методе, најизраженији антиоксидативни потенцијал запажен је код FUR екстракта (IC_{50} 28.73 μg/mL), док је од стандардних једињења најбољи антиоксидант и у овом случају била гална киселина (1.80 μg/mL). У односу на остала референтна једињења, сва четири екстракта су имала вредности упоредиве са рутином (42.61 μg/mL, $p > 0.05$). Знатно бољу активност на нивоу ABTS радикал-катјона, поред галне киселине, показали су и аскорбинска киселина и БХТ са IC_{50} вредностима око три пута мањим у односу на тестиране екстракте.

Супероксид радикал-анјон ($O_2^{\cdot -}$) је један од најчешће присутних слободних радикала у организму (*in vivo*) и прекурсор је других реактивних кисеоникових врста које су потенцијално рекативне са основним биомолекулима. Стога, смањење концентрације ових радикал-анјона је изузетно значајно у организму који је у стању оксидативног стреса. У примењеној методи са алкалним диметил сулфоксидом (DMSO), способност тестираних екстраката да „хватају" супероксид радикал-анјоне посматрана је у поређењу са референтним антиоксидантима (гална, аскорбинска и елагинска киселина, рутин, кверцетин и БХТ). Што се стандардних фенолних једињења тиче, најбољу и приближно једнаку ($p > 0.05$) антиоксидативну активност према $O_2^{\cdot -}$ испољили су кверцетин (IC_{50} 250.24 μg/mL) и елагинска киселина (285.95 μg/mL), а следи их добро познат антиоксидант гална киселина (360.09 μg/mL). Аскорбинска киселина је имала знатно вишу IC_{50} вредност (778.89 μg/mL). Најмање ефикасни антиоксиданти у овом тесту били су рутин и БХТ. У поређењу са референтним антиоксидантима, екстракт корена *F. hexapetala* (FHR) показао је најбољу активност, са IC_{50} вредношћу нешто вишом од галне киселине (432.27 μg/mL). Екстракти биљке *F. ulmaria* имали су приближно исту активност ($p > 0.05$) и нешто бољу од аскорбинске киселине. Екстракт са најслабијом антиоксидативном активношћу на нивоу $O_2^{\cdot -}$ био је надземни део *F. hexapetala* (FHA) са IC_{50} вредношћу више него дупло већом од екстракта корена исте биљке.

Азот моноксидни радикал ($NO^{\cdot}$ радикал) је у организму најчешће присутан услед различитих инфламаторних стања при којима настаје. $NO^{\cdot}$ радикал стварају и ослобађају бројне ћелије у организму, укључујући мождане и ендотелне ћелије, као и макрофаге, под дејством ензима азот оксид синтетазе (NOS). У биолошким системима је, међутим, NO_2^- крајњи дериват $NO^{\cdot}$ радикала јер је он изузетно рекативан и врло лако ступа у реакцију са хем групом, реактивним врстама кисеоника и другим биолошким материјалима као што је глутатион или незасићене масне киселине.[326] Најчешће коришћена метода за детекцију $NO^{\cdot}$ радикала јесте коришћењем Грисовог реагенса. Применом ове методе одређена је способност испитиваних екстраката да „хватају" тј. неутралишу $NO^{\cdot}$ радикал, а у односу на референтне антиоксиданте (гална, елагинска и аскорбинска киселина, рутин, кверцетин и БХТ). Као што се у *Табели 5.5.* може видети, сви биљни екстракти испољили су приближну активност ($p > 0.05$) са IC_{50} вредностима

које се крећу од 53.72 до 66.35 μg/mL. Изузетак чини FUA екстракт који је имао дупло слабију способност „хватања“ $NO^{\cdot}$ радикала (IC_{50} 127.24 μg/mL). Што се тиче чистих фенолних једињења, најизраженију активност показао је кверцетин (IC_{50} 1.74 μg/mL), а потом рутин (4.69 μg/mL) и гална киселина (4.79 μg/mL). IC_{50} вредности за елагинску и аскорбинску киселину су биле нешто више у односу на претходно наведена једињења, а синтетички антиоксидант БХТ није показао активност према $NO^{\cdot}$ радикалу ни у највишој испитиваној концентрацији од 100 μg/mL.

Табела 5.5. Антиоксидативна активност метанолних екстраката биљака F. ulmaria и F. hexapetala и стандардних антиоксиданата на нивоу неутрализације $DPPH^{\cdot}$, $ABTS^{+\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$ и $NO^{\cdot}$ радикала и капацитета хелатације

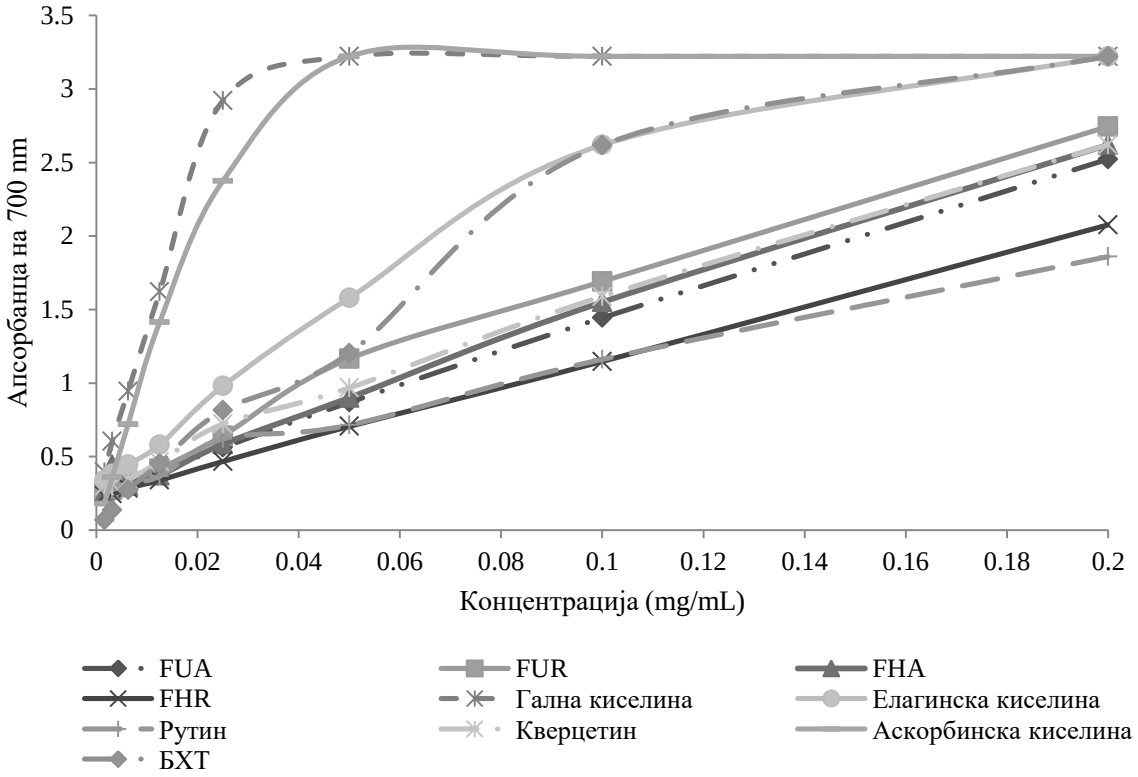
Екстракти и стандарди	IC_{50} (μg/mL)*				
	$DPPH^{\cdot}$ радикал	$ABTS^{+\cdot}$ радикал катјон	$O_2^{\cdot-}$ радикал анјон	$NO^{\cdot}$ радикал	Капацитет хелатације
FUA	16.41 ± 1.74[а]	36.75 ± 1.79[а]	611.80 ± 16.72[а]	127.24 ± 33.35[а]	> 4000
FUR	10.58 ± 0.86[б]	28.73 ± 1.64[а]	603.47 ± 15.83[а]	58.30 ± 29.21[б]	> 4000
FHA	13.47 ± 1.22[а, б]	34.52 ± 1.87[а]	1057.58 ± 17.41[б]	53.72 ± 15.09[б]	> 4000
FHR	26.27 ± 1.58[в]	36.44 ± 1.92[а]	432.27 ± 11.64[в]	66.35 ± 22.54[б]	> 4000
Гална киселина	2.08 ± 0.09[г]	1.80 ± 0.41[б]	360.09 ± 12.31[г]	4.79 ± 0.45[в]	> 4000
Елагинска киселина	8.84 ± 0.41[б, д]	767.80 ± 21.72[в]	285.95 ± 10.06[д]	14.42 ± 0.39[в]	> 4000
Аскорбинска киселина	5.87 ± 0.18[д, ђ]	13.18 ± 2.24[г]	778.89 ± 13.56[ђ]	29.87 ± 3.94[б, в]	–
Рутин	23.13 ± 1.42[в, е]	42.61 ± 2.06[а]	>1000	4.69 ± 1.34[в, г]	2131.14 ± 28.11
Кверцетин	17.49 ± 1.12[а]	228.84 ± 10.35[д]	250.24 ± 11.02[д]	1.74 ± 0.46[в, д]	> 4000
ЕДТА	–	–	–	–	2.69 ± 0.22
БХТ	20.86 ± 5.25[а]	12.79 ± 2.88[г]	> 2000	> 100	–

* IC_{50} вредности су одређене нелинеарном регресионом анализом (one way ANOVA). –, није тестирано. Резултати су изражени као средња вредност три независна мерења ± С.Д. (n = 3). Вредности у колони означене различитим словима у суперскрипту се статистички значајно разликују на $p < 0.05$.

Јони гвожђа су најефикаснији про-оксиданти који често могу бити присутни у храни где иницирају липидну пероксидацију и започињу ланчане реакције које воде до кварења намирница. У биолошким системима њихова интеракција са водоник пероксидом води до формирања високо реактивних хидроксил радикала. Ови процеси се могу спречити хелатизацијом јона гвожђа. Нарочито су фенолна једињења, са својим хидроксилним и карбоксилним групама, способна да вежу јоне гвожђа или бакра.[327] Резултати капацитета хелатације испитиваних екстраката приказани су у *Табели 5.5*. Сви тестирани екстракти, као и референтна фенолна једињења (гална киселина, елагинска киселина, кверцетин) испољили су слабу способност хелирања јона гвожђа (са IC_{50} вредностима преко 4000 μg/mL) у поређењу са ЕДТА (IC_{50} 2.69 μg/mL).

Хелатациону активност показао је једино рутин, који је био способан да у јако високој концентрацији (IC_{50} 2131.14 μg/mL) хелира јоне гвожђа.

Редуктивни капацитет карактерисан је реакцијом редукције Fe^{3+} јона у Fe^{2+} јон која се често користи како би се одредила ефикасност испитиваног материјала у процесу преноса електрона, што може послужити као јасан индикатор његове антиоксидативне активности.[273] Пораст апсорбанце реакционе смеше, при чему се боја мења од жуте до тамно плаве, указује на повећање редукционог капацитета услед пораста формирања гвожђе(II)-комплекса. На *Слици 5.9.* приказана је промена апсорбанце насталог комплекса у односу на концентрацију испитиваних екстраката и стандардних фенолних једињења (гална, аскорбинска и елагинска киселина, рутин, кверцетин и БХТ). График јасно показује да најнижи и приближно једнак редуктивни капацитет имају екстракт корена *F. hexapetala* (FHR) и рутин као стандардно једињење. Нешто бољи редуктивни потенцијал показали су екстракти надземних делова обе биљке, корена *F. ulmaria* и флавоноид кверцетин и то у растућем односу: FUA < FHA < кверцетин < FUR. Бутил хидрокситолуен (БХТ), као синтетички антиоксидант, испољио је знатно боље редукционе особине чије су вредности у истом рангу као и активност елагинске киселине. Најбоље редукционе особине запажене су управо у случају фенолних киселина, као што је већ поменута елагинска, али и аскорбинска и гална киселина које су имале максималне вредности апсорпције у опсегу концентрација од 0.05 до 0.2 mg/mL.



Слика 5.9. Редуктивни капацитет метанолних екстраката надземног дела и корена биљака F. ulmaria (FUA, FUR) и F. hexapetala (FHA, FHR) у поређењу са референтним антиоксидантима природног и синтетичког порекла

5.5.2. Инхибиција липидне пероксидације

Поред улоге природних антиоксиданата као заштитних компоненти у превенцији и лечењу неких здравствених обољења, они такође имају врло значајну улогу у превенцији и спречавању кварења хране услед дејства слободних радикала на липиде, односно развијања процеса липидне пероксидације. Оксидација липида у намирницама утиче на боју, укус, текстуру, нутритивну вредност хране, али може довести и до разних штетних последица при конзумирању хране која садржи потенцијално штетне производе ових реакција.[279] Липидна пероксидација укључује читав низ ланчаних реакција које су у природи аутокаталитичке, али које се могу инхибирати помоћу стандардних антиоксиданата, једињења изолованих из биљних материјала или екстраката биљака који поседују антиоксидативну активност.[328,329]

Способност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, као и стандардних антиоксиданата да инхибирају липидну оксидацију испитана је коришћењем различитих модел система. Један од ових система базиран је на формирању емулзије уље/вода (гвожђе-тиоцијанатна метода) са линолном киселином. Полинезасићене масне киселине, као што је линолна киселина (*cis*-9,12-октадекадиенска киселина), лако се оксидују у присуству кисеоника из ваздуха. Даља аутооксидација води до формирања пероксида линолне киселине, што се може детектовати на основу оксидације Fe^{2+} до Fe^{3+} у поменутој методи. На основу добијених резултата (*Табела 5.6.*), може се видети да су испитивани екстракти показали способност да редукују формирање хидропероксида. Највећу способност инхибирања липидне пероксидације у овом модел систему испољили су екстракти биљке *F. hexapetala* са приближним IC_{50} вредностима ($p > 0.05$), 20.80 μg/mL за FHA и 18.77 μg/mL за FHR. Добијене вредности су у рангу инхибиције коју је испољио природни антиоксидант кверцетин (24.60 μg/mL). Знатно слабију антиоксидативну активност на нивоу липидне пероксидације показали су екстракти *F. ulmaria*, чије су IC_{50} вредности биле неколико пута више у односу на екстракте *F. hexapetala*. Надземни део *F. ulmaria* је био нешто бољи антиоксидант (IC_{50} 50.06 μg/mL) у односу на корен исте биљке (77.23 μg/mL). У поређењу са испитиваним екстрактима, већина коришћених стандардних једињења испољила је знатно бољи антиоксидативни потенцијал. Изузетак чине једино аскорбинска киселина, која није успела да спречи липидну пероксидацију у тестираној концентрацији (1 mg/mL), и гална киселина чија је IC_{50} вредност била јако висока (255 μg/mL, $p < 0.05$) у односу на остале супстанце. Најизраженији антиоксидативни капацитет, са знатно нижим IC_{50} вредностима ($p < 0.05$) у односу на екстракте, показали су α-токоферол (0.56 μg/mL), елагинска киселина (1.37 μg/mL) и синтетички антиоксидант БХТ (2.41 μg/mL).

Други испитивани модел систем био је β-каротен/линолна киселина систем где β-каротен, у одсуству антиоксиданата, подлеже реакцијама које се могу и визуално пратити јер долази до губљења боје односно дисколорације β-каротена услед куповане оксидације β-каротена и линолне киселине, при чему настају слободни радикали. Резултати антиоксидативне активности екстраката и референтних једињења приказани

су у *Табели 5.6*. Осим елагинске киселине (IC_{50} 12.68 μg/mL), остала испитивана референтна једињења нису инхибирала оксидацију линолне киселине за 50% у испитиваним концентрацијама. За разлику од стандарда, испитивани екстракти су показали способност инхибирања оксидације β-каротена и линолне киселине, при чему су екстракти надземног дела имали знатно боље резултате (IC_{50} 69.47 μg/mL за FUA и 93.96 μg/mL за FHA) у односу на екстракте корена. Генерално гледано, екстракти надземног дела и корена *F. ulmaria* су испољили бољу антиоксидативну активност у овом модел систему, у односу на одговарајуће екстракте друге биљке.

Приликом испитивања антиоксидативне активности екстраката, поред два поменута модел система, коришћен је и месо модел систем. Липидна оксидација је врло чест проблем када се ради о храни богатој мастима и у току чувања могу настати различити секундарни производи оксидације који могу реаговати са биомолекулима и испољити цитотоксичне и генотоксичне ефекте. Један од ових производа је малондиалдехид (MDA), који се најчешће користи као маркер оксидативног стреса и индекс липидне пероксидације.[330] У овом тесту, свеже свињско месо коришћено је као модел хране како би се утврдило да ли додатак испитиваних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* може ефикасно инхибирати липидну пероксидацију у месу током чувања у одређеном временском периоду.

Табела 5.6. Инхибиција липидне пероксидације екстраката биљака F. ulmaria и F. hexapetala и стандардних антиоксиданата у различитим модел системима

Екстракти и стандарди	IC_{50} (μg/mL)	
	Модел систем емулзија уље/вода	β-каротен/линолна киселина модел систем
FUA	50.06 ± 2.15[а]	69.47 ± 2.56[а]
FUR	77.23 ± 2.94[б]	138.36 ± 7.12[б]
FHA	20.80 ± 1.44[в, ђ]	93.96 ± 2.32[в]
FHR	18.77 ± 1.06[в, ђ]	263.83 ± 16.34[г]
Гална киселина	255 ± 12.21[г]	>200
Елагинска киселина	1.37 ± 0.16[д]	12.68 ± 0.94[д]
Аскорбинска киселина	>1000	–
Рутин	9.70 ± 0.51[в, д]	>200
Кверцетин	24.60 ± 1.23[ђ]	>200
БХТ	2.41 ± 0.79[д]	–
α-токоферол	0.56 ± 0.08[д]	>1000

IC_{50} вредности су одређене нелинеарном регресионом анализом (one way ANOVA).
–, није тестирано. Резултати су изражени као средња вредност три независна мерења ± С.Д. (n = 3).
Вредности у колони означене различитим словима у суперскрипту се статистички значајно разликују на $p < 0.05$.

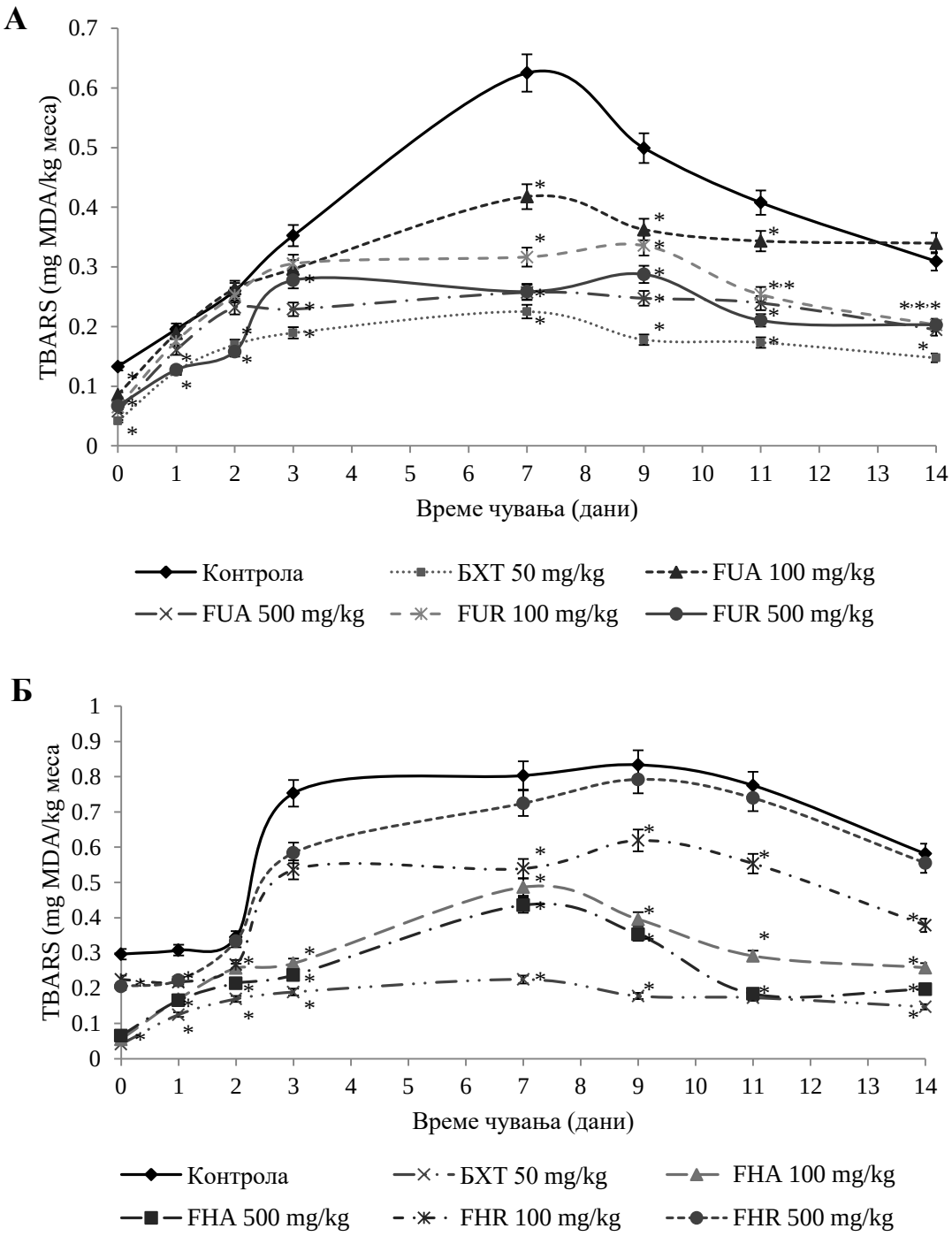
MDA и други производи липидне оксидације могу реаговати са тиобарбитурном киселином (TBA), при чему настају комплекси названи тиобарбитурна киселина реактивне супстанце (TBARS), који се могу детектовати спектрофотометријски на 532 nm. Како су сви екстракти претходно показали висок антиоксидативни капацитет, инкорпорирани су у свеже свињско месо у две дозе (100 и 500 mg/kg), а њихова активност у овом модел систему, изражена у TBARS јединицама, поређена је са синтетичким антиоксидантом бутил хидрокситолуеном (БХТ) аплицираним у концентрацији 50 mg/kg и групом без додатка антиоксиданата.

Као што је и очекивано, у поређењу са контролном групом без икаквог адитива, БХТ (50 mg/kg) је инхибирао формирање TBARS у највећем проценту током трајања читавог експеримента (*Слика 5.10.* А). Интересантно је приметити да су екстракти FUA и FUR у концентрацији 500 mg/kg имали вредности TBARS врло сличне и незнатно више ($p > 0.05$) у поређењу са БХТ. Вредности ихнибиције липидне оксидације у месу у групама којима су додати FUA и FUR у дози 100 mg/kg нису биле статистички значајно различите све до 3. дана чувања, а након тог периода FUR (100 mg/kg) је довео до нижих TBARS вредости ($p < 0.05$) у односу на контролу. Све вредности опадају од 7. дана надаље, а разлог највероватније лежи у нестабилности MDA и других кратколанчаних органских производа и испарљивих продуката мале молекулске тежине који настају у процесу липидне оксидације. Оксидација ових продуката води до стварања алкохола и киселина који не могу реаговати са TBA, па тако и не могу бити детектовани TBA тестом.[279,330]

Резултати испитивања екстраката биљке *F. hexapetala* у месо модел систему пратили су сличан тренд (*Слика 5.10.* Б). У контролној групи TBARS вредности су расле током времена чувања, све до 9. дана. FHA и FHR екстракти су испољили концентрационо-зависстан антиоксидативни ефекат. Апликација ових екстраката у обе концентрације резултирала је нижим TBARS вредностима током читавог периода чувања, у поређењу са контролним узорком ($p < 0.05$). Свакако, БХТ (50 mg/kg) је имао највећи степен инхибиције формирања TBARS. Као и у претходном случају, TBARS вредности у свим испитиваним групама, са и без антиоксиданата, расле су до 7. дана чувања, при чему је код контролне групе и обе групе третиране FHR екстрактом тај процес настављен и 9. дана. Дакле, након 7 односно 9 дана чувања на 4°C, вредности TBARS су се смањивале све до краја испитиваног периода. Из горе наведеног разлога, у том периоду добијени продукти липидне пероксидације нису могли бити измерени примењеном методом. Интересантно је приметити да су, као и у случају екстраката *F. ulmaria*, оба екстракта *F. hexapetala* у примењеним концентрацијама у односу на контролну групу, инхибирали или смањили настанак TBARS у месу, све док их је било могуће измерити.

Месо модел системи који су садржали веће количине биљних екстраката су имали и мање количине TBARS у току читавог периода чувања ($p < 0.05$). На приказаним дијаграмима (*Слика 5.10.* А и Б) може се видети да су најефикаснији били екстракти FUR и FHA у вишој концентрацији (500 mg/kg). Инхибиција продукције TBARS је свакако уско повезана са антиоксидативном активношћу и способношћу

„хватања“ слободних радикала коју испољавају испитивани екстракти. Међутим, највиши степен инхибиције липидне пероксидације у месу имао је синтетички антиоксидант БХТ (50 mg/kg) и тако показао да има најјачи превентивни ефекат када се ради о процесу развијања липидне оксидације у непрерађеном месу.

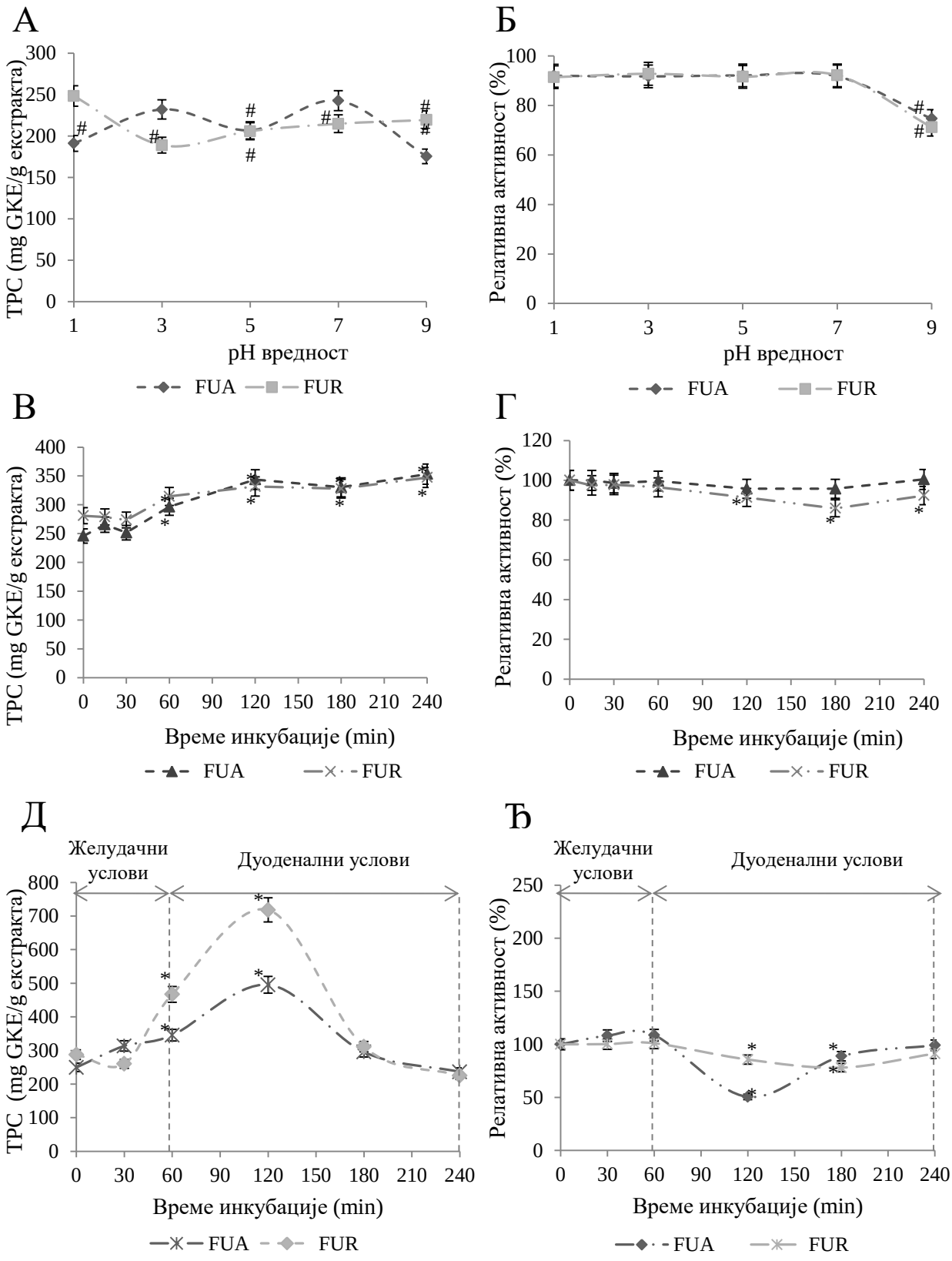


Слика 5.10. Промене у липидној оксидацији тј. нивоу TBARS у месо модел системима којима су додати FUA и FUR екстракти (А), FHA и FHR екстракти (Б) у различитим концентрацијама у временском интервалу од 14 дана. Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± С.Д. (n = 5).

5.5.3. Стабилност испитиваних екстраката (pH, термална и у току in vitro дигестије)

Употреба биљног материјала (лековито биље, зачини, воће и поврће) најчешће подразумева различите видове обраде, која може довести до промена у саставу биоактивних компоненти и антиоксидативне активности материјала.[331] У интересу, како научне заједнице, тако и прехрамбене индустрије и конзумената, јесте да се утврди степен тих промена како би се благотворни ефекти биљног материјала могли искористити на најбољи могући начин. Стога је испитивање стабилности екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* базирано на одређивању промене садржаја укупних фенолних једињења и антиоксидативне активности, када су узорци подвргнути промени pH вредности средине, кувању на 100°C у трајању од 240 min и симулираном процесу *in vitro* дигестије. Дакле, симултано је одређивана стабилност биолошки активних компонената и промена њиховог антиоксидативног потенцијала. На *Сликама 5.11.* и *5.12.* приказани су компаративни дијаграми pH стабилности, термалне стабилности и стабилности у току *in vitro* дигестије екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, изражено кроз садржај укупних фенола (TPC) и релативну антиоксидативну активност на нивоу DPPH радикала. Ове анализе су од великог значаја, јер се при посматрању различитих видова стабилности могу предвидети особине и активност екстраката у различитим условима.

На *Слици 5.11.* приказани су резултати анализе стабилности FUA и FUR екстраката. Испитивани екстракти су подвргнути различитим pH вредностима (pH 1–9) и кувани 240 min на температури кључања, а у току тих процеса одређивана је промена садржаја укупних фенолних једињења (TPC) и способност „хватања“ DPPH радикала. Такође, симулиран је и процес *in vitro* дигестије FUA и FUR, а стабилност је праћена на исти начин. У различитим pH условима, вредности TPC у екстрактима FUA и FUR су биле несталне (*Слика 5.11. А*). Најнижа вредност TPC у FUA екстракту забележена је на pH 9, а концентрација фенолних једињења расла је следећим редоследом pH вредности: pH 9 < 1 < 5 < 3 < 7. Што се тиче FUR екстракта, највећа количина фенолних једињења забележена је на pH 1. На осталим pH вредностима TPC су биле ниже и статистички различите ($p < 0.05$) у односу на нетретирани екстракт. У односу на pH 1, TPC у FUR су опадале следећим редоследом pH 1 > 9 > 7 > 5 > 3. Релативна антиоксидативна активност оба екстракта, базирана на DPPH методи, била је прилично висока на свим испитиваним pH вредностима, изузимајући pH 9 (*Слика 5.11. Б*). Такође, није било статистички значајне разлике између активности FUA и FUR у поређењу са нетретираним екстрактима ($p > 0.05$), осим вредности на pH 9.

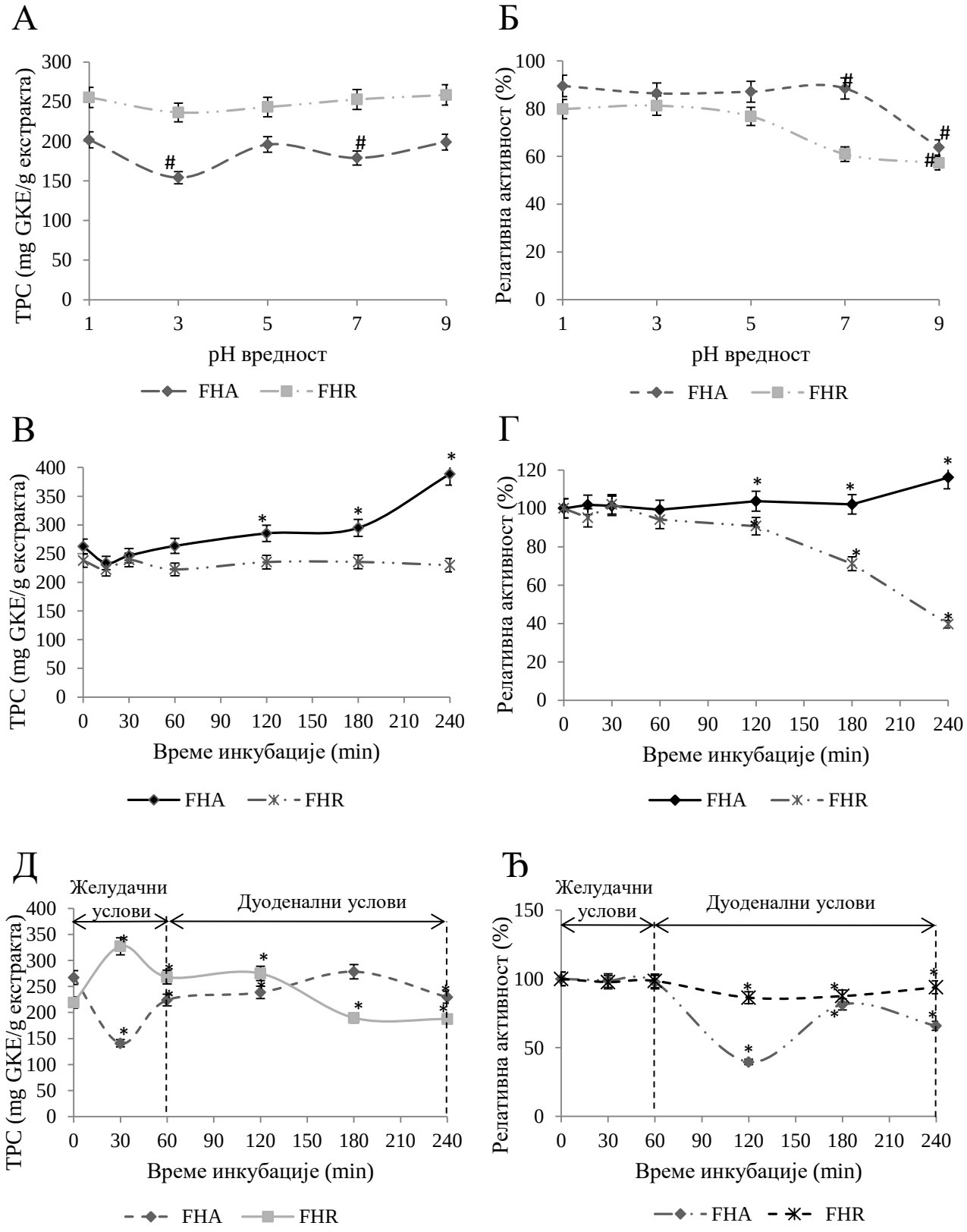


Слика 5.11. pH стабилност (А, Б), термална стабилност (В, Г) и стабилност у току in vitro дигестије (Д, Ђ) метанолних екстраката F. ulmaria (FUA и FUR) праћена преко садржаја укупних фенолних једињења и DPPH методе. Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± С.Д. ($n = 3$). #$p < 0.05$ поређено са нетретираним екстрактима. *$p < 0.05$ поређено са нултим временом (без икаквог третмана).

Утицај времена инкубирања FUA и FUR екстракта на температури кључања приказан је на *Сликама 5.11. В и Г*. ТРС вредности за оба узорка у току почетних 30 min кувања нису биле статистички значајно различите ($p > 0.05$) у поређењу са узорцима који нису тетирани (нулто време). Међутим, са почетком на 60 min па све до краја третмана, ТРС вредности за оба екстракта су биле у порасту ($p < 0.05$) поређено са нултим временом. Релативна антиоксидативна активност FUA и FUR екстраката била је око 100% све до 60 min, а затим је примећено незнатно опадање вредности до 180 min, посебно код FUR екстракта.

Како би се добило више информација о антиоксидативној активности и понашању FUA и FUR екстраката у гастроинтестиналном тракту, екстракти су подвргнути *in vitro* симулацији дигестије, а резултати су приказани на *Слици 5.11. Д и Ђ*. ТРС вредности за оба екстракта пратиле су сличан тренд током трајања инкубације. Након 30 min дигестије у присуству пепсина, вредности ТРС нису биле статистички значајно различите ($p > 0.05$) у односу на вредности на почетку процеса. Затим је садржај укупних фенола растао све до 120 min дигестије ($p < 0.05$), посебно код FUR екстракта, а потом је дошло до опадања вредности све до краја инкубационог периода. На основу добијених резултата може се закључити да су оба екстракта имала релативно високу антиоксидативну активност на нивоу DPPH радикала (*Слика 5.11. Ђ*) у желудачним условима симулиране дигестије, до 60 min. Релативна антиоксидативна активност у прва два сата дигестије у дуоденалној фази била је статистички значајно различита ($p < 0.05$) у поређењу са нетретираним узорцима. Такође, у поређењу са желудачном фазом дигестије, антиоксидативна активност FUA и FUR је значајно смањена ($p < 0.05$) у дуоденалним условима. На крају овог симулираног процеса, вредности релативне антиоксидативне активности оба екстракта су незнатно порасле.

На *Слици 5.12.* приказани су резултати стабилности метанолних екстраката биљке *F. hexapetala* (FHA и FHR). Ефекат промене pH вредности на укупан садржај фенолних једињења (ТРС) испитиваних екстраката био је незнатан (*Слика 5.12. А*). ТРС вредности за FHR се нису значајно промениле на свим тестираним pH вредностима, док је ТРС за FHA био значајно смањен на pH 3 и 7 ($p < 0.05$). Резултати релативне антиоксидативне активности FHA и FHR при промени pH вредности (*Слика 5.12. Б*) јасно показују да је екстракт прилично стабилан у pH опсегу од 1-7 ($p > 0.05$). На pH 9 је релативна антиоксидативна активност FHA била знатно нижа у поређењу са нетретираним узорком ($p < 0.05$). С друге стране, способност хватања DPPH радикала од стране FHR екстракта била је знатно боља на pH вредностима од 1-5. На pH од 7-9 релативна активност FHR се смањила за приближно 40% ($p < 0.05$) у поређењу са истим узорком пре третмана (100%). Стабилност екстраката *F. hexapetala* у току термичке обраде одређивана је на већ поменут начин. Екстракти FHA и FHR су подвргнути кувању 240 min на 100°C и у току процеса одређиван је укупан садржај фенолних једињења и релативна антиоксидативна активност на нивоу DPPH радикала (*Слика 5.12. В и Г*). ТРС оба екстракта се незнатно смањио након 15 min загревања.



Слика 5.12. pH стабилност (А, Б), термална стабилност (В, Г) и стабилност у току in vitro дигестије (Д, Ђ) метанолних екстраката F. hexapetala (FHA и FHR) праћена преко садржаја укупних фенолних једињења и DPPH методе. Резултати су представљени као средња вредност три независна мерења ± С.Д. (n = 3). #p < 0.05 поређено са нетретираним екстрактима. *p < 0.05 поређено са нултим временом (без икаквог третмана).

Након 15 min загревања, садржај фенолних једињења у FHA екстракту је растао до 240 min третмана ($p < 0.05$), док се TPC вредности за FHR нису значајно мењале све до краја процеса. Што се тиче релативне антиоксидативне активности екстраката, нису примећене значајније промене све до првих 60 min загревања, а од 120 min па до 240 min термичке обраде забележене су статистички значајне разлике у антиоксидативној активности ова два екстракта ($p < 0.05$). Док је од 120 min па до краја третмана антиоксидативна активност FHA расла, вредности за FHR су се смањивале. Поредећи дијаграме са резултатима, може се закључити да промена антиоксидативне активности екстраката *F. hexapetala* у току загревања прати промену садржаја укупних фенолних једињења.

Стабилност FHA и FHR екстраката у присуству дигестивних ензима и дуоденалних параметара испитивана је, као и у претходном случају, како би се добиле информације о ефектима и потенцијалној активности екстраката у *in vivo* условима. Резултати *in vitro* симулације гастроинтестиналне дигестије FHA и FHR (TPC вредности и релативна антиоксидативна активност) приказани су на *Слици 5.12. Д и Ђ*. Антиоксидативна активност екстраката се није значајно мењала у току варења у присуству пепсина (желудачни услови, до 60 min, $p > 0.05$). У међувремену, TPC вредности за FHR су нагло порасле на средини желудачне фазе, а потом врло мало опале ($p < 0.05$). У случају FHA екстракта, TPC вредности у желудачним условима су биле управо супротне, на 30 min су значајно опале, да би се до краја ове фазе незнатно повећале. У дуоденалној фази релативна антиоксидативна активност FHR екстракта се мало, али статистички значајно ($p < 0.05$) смањила, и остала приближно константна до краја симулације дигестије. У овој фази, TPC вредности FHR екстракта су се такође смањивале све до краја задатог периода (240 min). Релативна антиоксидативна активност FHA екстракта под дуоденалним условима значајно је опала на 120 min, а онда незнатно порасла на 180 min и остала без драстичних промена све до краја експеримента. Под истим условима (дуоденална фаза) TPC вредност FHA екстракта се повећала на 180 min ($p < 0.05$), а потом је на крају третмана садржај фенолних једињења био умањен.

5.6. Антимикробна активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

5.6.1. Антибактеријска активност

Антибактеријска активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* тестирана је на панелу од 14 бактеријских врста, од којих су шест Грам позитивне и осам врста Грам негативне. Коришћена је микродилуциона метода при чему су резултати изражени као минимална инхибиторна концентрација испитиваног узорка (MIC), односно најнижа концентрација која инхибира раст микроорганизма, и приказани су у *Табели 5.7.* Резултати антибактеријске активности екстраката поређени су са чистим

фенолним једињењима (гална киселина и кверцетин) и референтним антибиотицима (амрацин, еритромицин и хлорамфеникол).

Екстракти надземног дела и корена обе испитиване биљке (FUA, FUR, FHA и FHR) показали су активност на свим испитиваним бактеријама са минималним инхибиторним концентрацијама у рангу од 0.156 –10 mg/mL. Бактеријска врста *P. aeruginosa* (ATCC 10145) испољила је резистентност на деловање екстраката биљке *F. hexapetala* (MIC > 10.00 mg/mL), док су екстракти FUA и FUR испољили незнатну антимикробну активност са истом MIC вредношћу од 5.00 mg/mL. Такође, екстракти су слично деловали и на изолат исте бактерије (*P. aeruginosa* FSB 37), који је био резистентан на дејство FHR екстракта, док је код осталих екстраката забележена MIC 5.00 mg/mL. Испитивани екстракти су испољили исте вредности MIC (5.00 mg/mL) и у случају бактерија *E. coli* (FSB 25922) и *K. pneumoniae* (ATCC 70063), при чему FHR екстракт поново није испољио активност на *E. coli* у аплицираним концентрацијама, док је деловао инхибиторно на раст *K. pneumoniae* у јако високој концентрацији (10.00 mg/mL). Идентичне MIC вредности екстраката (5.00 mg/mL) забележене су код изолата још једне G− бактерије *A. chroococum* (FSB 14), и једне G+ врсте *B. mycoides* (FSB 1), где се FHR екстракт поново показао као најслабији (10.00 mg/mL). Нешто бољи антимикробни ефекат испитивани екстракти су испољили на другу тестирану врсту из соја *Bacillus, B. subtilis* (ATCC 6633), при чему су FUA, FUR и FHA били знатно ефикаснији (MIC 2.50 mg/mL) од FHR екстракта (10 mg/mL). Дупло нижу MIC вредност (1.25 mg/mL) показали су екстракти FUA, FUR и FHA при деловању на изолате *P. fluorescens* (FSB 28), *A. tumefaciens* (FSB 11) и стандардну културу *S. aureus* (ATCC 25923). Тренд ниже ефикасности FHR екстракта се и у овим случајевима наставио, тако да су MIC вредности за овај екстракт биле од 2.50 до 5.00 mg/mL. Бактеријске врсте које су се показале као најосетљивије на деловање испитиваних екстраката су *E. coli* (ATCC 25922), *M. lysodeikticus* (ATCC 4698), и изолати *S. aureus* (FSB 30) и *E. faecalis* (FSB 24). У случају *E. faecalis*, на основу добијених резултата можемо говорити о доброј антибактеријској активности само екстраката биљке *F. ulmaria* (FUA, FUR) са идентичном MIC вредношћу 0.3125 mg/mL. Исти ниво активности FUA, FUR, али и FHA, показали су у третману *M. lysodeikticus*. Једино у два случаја, код врста *E. coli* и изолата *S. aureus*, сва четири испитивана екстракта су испољили јако висок антибактеријски потенцијал. Ефикасност екстраката обе испитиване биљке у спречавању раста и развоја ове две бактеријске врсте кретала се у јако малом распону, од 0.625 mg/mL па до најнижих MIC вредности 0.156 mg/mL.

У поређењу са чистим фенолним једињењима, галном киселином и кверцетином, са сигурношћу се може рећи да су екстракти са највећим антимикробним потенцијалом били знатно ефикаснији на најосетљивије бактеријске врсте (*E. coli*, *M. lysodeikticus*, и изолате *S. aureus, E. faecalis*) у односу на кверцетин. Што се тиче галне киселине, она је показала јако добро антимикробно деловање, посебно на G+ бактерије. Једино је код *E. coli* екстракт FUA имао нижу MIC вредност, у поређењу са галном киселином.

Табела 5.7. Антибактеријска активност екстраката биљака F. ulmaria (FUA, FUR) и F. hexapetala (FHA, FHR), у поређењу са чистим фенолним једињењима (гална киселина и кверцетин) и референтним антибиотицима (амрацин, еритромицин и хлорамфеникол)

Бактеријске врсте		MIC вредности*								
		Екстракти				*Фенолна једињења*		*Антибиотици*		
		FUA	FUR	FHA	FHR	G	K	A	E	H
P. aeruginosa ATCC	G−	5.00	5.00	>10	>10	>1	>1	5	>10	>10
P. aeruginosa FSB	G−	5.00	5.00	5.00	>10	>1	>1	5.00	>10	>10
P. fluorescens FSB	G−	1.25	1.25	1.25	5.00	0.25	>1	–	0.3125	10.00
K. pneumoniae ATCC	G−	5.00	5.00	5.00	10.00	>1	>1	0.625	>10	10.00
E. coli ATCC	G−	0.156	0.625	0.3125	0.625	0.25	1.00	0.3125	0.156	10.00
E. coli FSB	G−	5.00	5.00	5.00	>10	>1	>1	0.625	–	10.00
A. tumefaciens FSB	G−	1.25	1.25	1.25	5.00	0.25	>1	–	0.3125	10.00
A. chroococum FSB	G−	5.00	5.00	5.00	10.00	0.25	>1	–	5.00	5.00
M. lysodeikticus ATCC	G+	0.3125	0.3125	0.3125	5.00	0.125	>1	–	< 0.078	1.25
B. subtilis ATCC	G+	2.50	2.50	2.50	10.00	0.25	>1	–	10.00	10.00
B. mycoides FSB	G+	5.00	5.00	5.00	10.00	0.25	>1	–	5.00	10.00
S. aureus ATCC	G+	1.25	1.25	1.25	2.50	0.125	>1	–	2.50	1.25
S. aureus FSB	G+	0.156	0.156	0.156	0.3125	0.125	0.50	–	2.50	10.00
E. faecalis FSB	G+	0.3125	0.3125	1.25	2.50	0.125	>1	1.25	10.00	2.50

* MIC – минимална инхибиторна концентрација изражена у mg/mL за биљне екстракте, галну киселину и кверцетин, док је за антибиотике изражена у μg/mL; G – гална киселина; K – кверцетин; A – амрацин; E – еритромицин; H – хлорамфеникол; – није тестирано.

Ипак, MIC вредности, како екстраката, тако и чистих фенолних једињења, су знатно више и нису лако упоредиве са вредностима антибактеријске активности добијеним за стандардне антибиотике. Амрацин, хлорамфеникол и еритромицин су показали јако ниске минималне инхибиторне концентрације које се изражавају у μg/mL.

5.6.2. Антифунгална активност

Једанаест врста гљива, десет плесни од којих су две *Trichoderma spp.*, две *Penicillium spp.*, две *Aspergillus spp.*, *F. oxysporum, A. alternata, D. stemonitis* и *P. fastigiata* и једна врста из рода квасаца (*C. albicans*), коришћене су како би се испитала антифунгална активност метанолних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*. Резултати су представљени у виду минималне инхибиторне концентрације (MIC) и презентовани у *Табели 5.8.* Поред тестирања екстраката, вршено је и испитивање антифунгалне активности галне киселине и кверцетина, као и стандардних антимикотика нистатина, флуконазола, кетоконазола и клотримазола. Неколико врста гљива је било потпуно резистентно на деловање свих испитиваних екстраката (MIC > 10 mg/mL). Ту се убрајају *A. niger*, *A. alternata* и *D. stemonitis*, док је *C. albicans* показала резистентност на све екстракте, сем FHA чија је MIC вредност била јако висока (10 mg/mL). На врсту *A. glaucus* екстракти корена обе биљке нису имали никакву активност, док су екстракти надземних делова били умерено активни, са MIC вредностима 5.00 mg/mL за FUA и 2.50 mg/mL за FHA. Гљиве из рода *Trichoderma* биле су резистентне на FHR екстракт, FUR је показао јако ниску активност (MIC 10 mg/mL) за обе врсте, а екстракти надземних делова су били нешто ефикаснији са MIC вредностима 2.50 и 5.00 mg/mL. У третману врста из рода *Penicillium*, екстракти су били знатно активнији у третману *P. cyclopium* (MIC за FUA, FHA и FHR 2.50 mg/mL и за FUR 5.00 mg/mL), у односу на *P. canescens* где је најнижу MIC вредност имао екстракт FHA (5.00 mg/mL). Највиши антифунгални потенцијал показали су екстракти FHA у третману гљиве *F. oxysporum* и FHR у третману гљиве *P. fastigiata*, са минималном инхибиторном концентрацијом од 1.25 mg/mL.

Чиста фенолна једињења испољила су известан ниво инхибиције раста и развоја испитиваних гљива, при чему је гална киселина имала јако висок степен антифунгалне активности на гљиву *P. fastigiata* са MIC 0.0156 mg/mL. Ипак, све испитиване фунгалне врсте су највећу осетљивост показале на стандардне и комерцијално доступне антимикотике. Нистатин (MIC 0.078 – 1.00 μg/mL), флуконазол (5.00 – 10.00 μg/mL), кетоконазол (0.156 – 10 μg/mL) и клотримазол (0.156 – 1.25 μg/mL) су били знатно активнији, не само у односу на испитиване екстракте, већ и у поређењу са коришћеним фенолним једињењима.

Табела 5.8. Антифунгална активност екстраката биљака F. ulmaria (FUA, FUR) и F. hexapetala (FHA, FHR), у поређењу са чистим фенолним једињењима (гална киселина и кверцетин) и референтним антимикотицима (нистатин, флуконазол, кетоконазол и клотримазол)

	MIC вредности*									
Фунгалне врсте	*Екстракти*				*Фенолна једињења*		*Антимикотици*			
	FUA	FUR	FHA	FHR	G	K	N	F	Ket.	Kl.
C. albicans ATCC 10259	>10	>10	10.00	>10	>1	>1	1.00	–	–	–
T. harzianum FSB 12	2.50	10.00	5.00	>10	>1	>1	0.078	10.00	5.00	–
T. longibrachiatum FSB 13	5.00	10.00	5.00	>10	>1	>1	0.078	>10	1.25	–
P. cyclopium FSB 23	2.50	5.00	2.50	2.50	1.00	1.00	1.25	10.00	0.156	–
P. canescens FSB 24	10.00	>10	5.00	10.00	1.00	1.00	1.25	–	1.25	1.25
A. niger FSB 31	>10	>10	>10	>10	>1	>1	–	>10	0.625	–
A. glaucus FSB 32	5.00	>10	2.50	>10	0.50	1.00	0.625	–	2.50	1.25
F. oxysporum FSB 91	2.50	2.50	1.25	10.00	1.00	0.50	–	5.00	0.3125	–
A. alternata FSB 51	>10	>10	>10	>10	1.00	1.00	1.25	–	5.00	0.156
D. stemonitis FSB 41	>10	>10	>10	>10	>1	1.00	5.00	–	5.00	0.156
P. fastigiata FSB 81	5.00	10.00	2.50	1.25	0.0156	0.50	1.25	–	10.00	0.3125

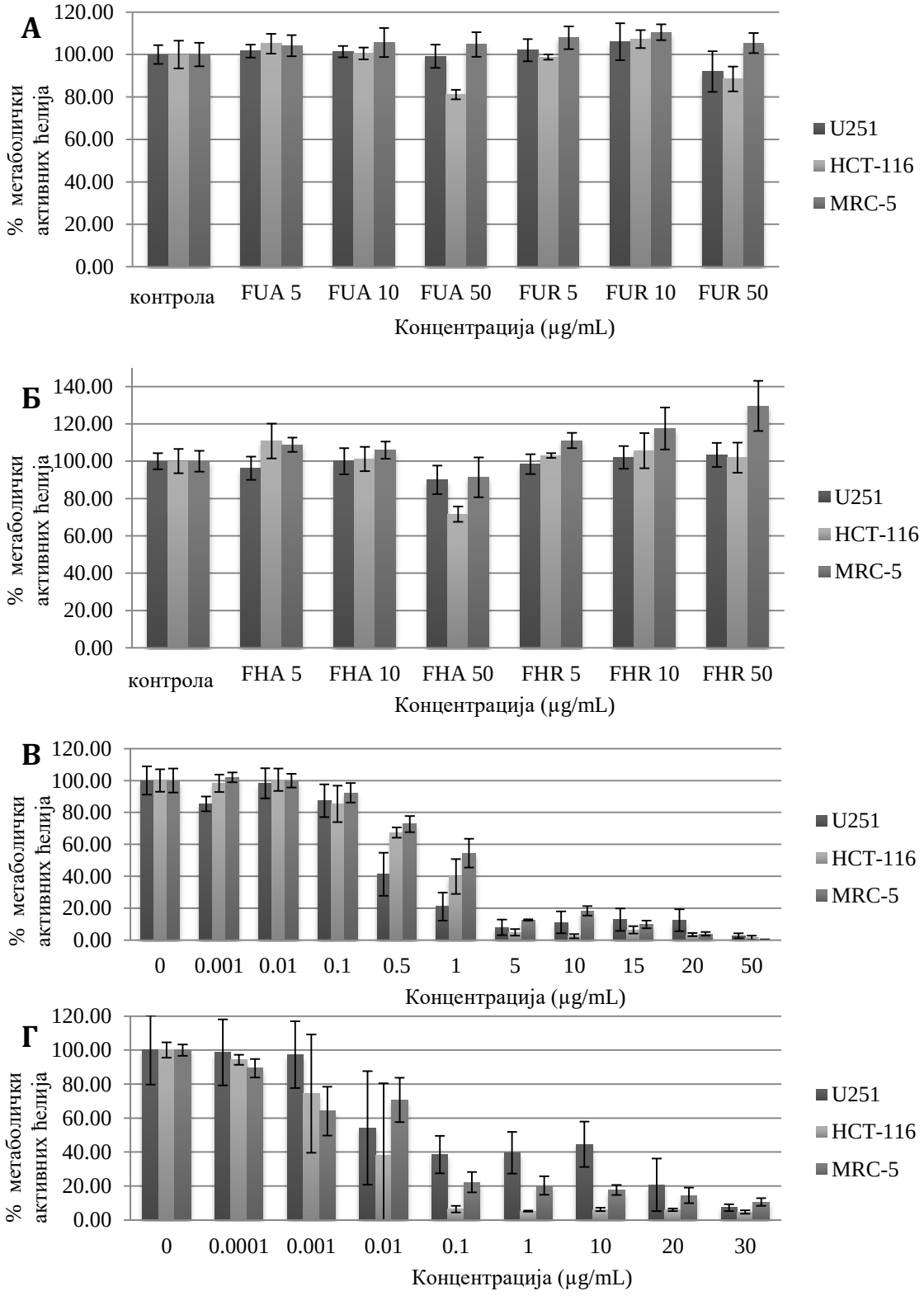
* MIC – минимална инхибиторна концентрација изражена у mg/mL за биљне екстракте, галну киселину и кверцетин, док је за антибиотике изражена у μg/mL; G – гална киселина; K – кверцетин; N – нистатин; F – флуконазол; Ket. – кетоконазол; Kl. – клотримазол; – није тестирано.

5.7. Цитотоксична активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

Цитотоксична активност екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* тестирана је на три ћелијске линије: хумана ћелијска линија канцера дебелог црева (HCT-116), хумана ћелијска линија глиобластома (U251) и хумана ћелијска линија фибробласта плућа (MRC-5) и мерена је као виабилност ћелија. Поред екстраката, испитивана је и способност смањења преживљавања одабраних ћелијских линија под утицајем познатог антиканцерогеног лека цисплатине, као и винбластина, једињења природног порекла које је укључено у стандардне терапије различитих типова канцера. Поменута два једињења служила су као позитивне контроле. На *Слици 5.13.* графички је представљена средња вредност израчунатих процената метаболички активних ћелија у односу на концентрацију испитиваног узорка или стандарда ± С.Д. шест независних понављања. Крајњи резултати су изражени преко IC_{50} вредности ± С.Е.М. и приказани у *Табели 5.9.*

Испитивани екстракти, у свим примењеним концентрацијама (5, 10 и 50 μg/mL), нису испољили значајну токсичност на MRC-5 ћелијама. Такође, екстракти обе биљке нису проузроковали детектабилно смањење виабилности U251 ћелија. У овом случају може се уочити да су екстракти FUR и FHA у највишој тестираној концентрацији (50 μg/mL) довели до незнатног смањења метаболички активних U251 ћелија, на око 90% (*Слика 5.13. А и Б*). Код HCT-116 ћелија примећује се опадање виабилности, и то једино при третману са највишом концентрацијом екстраката FUA, FUR и FHA (50 μg/mL). Узимајући у обзир проценат метаболички активних ћелија, приказан на *Слици 5.13.*, може се закључити да испитивани екстракти нису показали значајан цитотоксични ефекат у свим примењеним концентрацијама и да су све IC_{50} вредности више од 50 μg/mL.

Када говоримо о референтним једињењима, цисплатин, који је тестиран у опсегу концентрација 0.001 – 50 μg/mL, испољио је снажне цитотоксичне ефекте на свим коришћеним ћелијским линијама. Са *Слике 5.13. В* се може видети да су најнижи проценти метаболички активних ћелија у третману са цисплатином забележени код ћелијских линија U251 и MRC-5. Ову констатацију потврђују и израчунате IC_{50} вредности за цисплатину, које се крећу од 0.36 μg/mL за U251, преко 0.42 μg/mL за MRC-5, па до 0.77 μg/mL за HCT-116 ћелије (*Табела 5.9.*). Иако је цисплатина показала високу цитотоксичну активност на изабраним ћелијским линијама, добијене IC_{50} вредности су мање и значајно се разликују у односу на вредности добијене анализом другог референтног стандарда винбластина.



Слика 5.13. Проценат метаболички активних ћелија код HCT-116, U251 и MRC-5 ћелијских линија третираних екстрактима F. ulmaria (А), екстрактима F. hexapetala (Б), цисплатином (В) и винбластином (Г) у различитим концентрацијама. Резултати представљени као средња вредност 6 независних мерења (n = 6).

Винбластин, алкалоидно једињење природног порекла изоловано из винке или мадагаскарског зимзелена (*Catharanthus roseus*), показао је највиши степен цитотоксичне активности према свим ћелијским линијама укљученим у експеримент. Најснажнији цитотоксични ефекат винбластин је испољио на ћелијама хуманог глиобластома (U251) са IC_{50} вредношћу 0.008 μg/mL, потом следе HCT-116 ћелије (0.009 μg/mL) и нешто нижа, али значајна вредност од 0.024 μg/mL за MRC-5 ћелијску линију. У зависности од ћелијске линије, цитотоксична активност винбластина је 17.5 до 85.5 пута већа од цисплатине.

Табела 5.9. Цитотоксична активност екстраката F. ulmaria и F. hexapetala и стандардних једињења (цисплатина и винбластин) тестирана на три ћелијске линије (U251, HCT-116 и MRC-5) и изражена преко IC_{50} вредности (μg/mL)

Екстракти и стандарди	IC_{50} вредности (μg/mL)*		
	U251	HCT-116	MRC-5
FUA	> 50	> 50	> 50
FUR	> 50	> 50	> 50
FHA	> 50	> 50	> 50
FHR	> 50	> 50	> 50
Цисплатина	0.36 ± 0.04	0.77 ± 0.06	0.42 ± 0.07
Винбластин	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.024 ± 0.003

*IC_{50} вредности су одређене применом нелинеарне регресионе анализе (one way ANOVA). Резултати су изражени као средња вредност шест независних мерења ± С.Е.М. (n = 6).

5.8. Антиинфламаторна активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

5.8.1. In vitro антиинфламаторна активност

Антиинфламаторна активност метанолних екстраката надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* испитивана је у *in vitro* условима тако што је мерена способност инхибиције синтезе простагландина од стране ензима циклооксигеназе-1 и циклооксигеназе-2 (COX-1 и COX-2), а такође је испитивана и способност екстраката да инхибирају експресију COX-2 гена у THP-1 макрофагима. Резултати су приказани у *Табели 5.10.*, изражени у процентима инхибиције (%) ензимске активности и експресије гена, а представљају средњу вредност четири независна мерења ± С.Д.

Добијени резултати инхибиције активности COX-1 указују да су сви екстракти, у испитиваној концентрацији (50 μg/mL), испољили известан степен инхибиције ензимске активности. Највишу активност имали су екстракти надземног дела обе биљке, FUA са инхибицијом COX-1 од 62.84% и FHA чија је инхибиторна активност била 59.49%, при чему ове вредности нису статистички различите ($p > 0.05$). Екстракт корена *F. ulmaria* имао је скоро дупло нижи проценат инхибиције COX-1 (32.11%) у односу на екстракте надземних делова обе биљке ($p < 0.05$), али је поменута вредност знатно виша у поређењу са инхибицијом FHR екстракта (13.12%). Стандардни НСАИЛ индометацин је у концентрацији од 1.25 μM инхибирао ензимску активност COX-1 за 49.63%. Иако се ова вредност статистички значајно не разликује од активности FHA екстракта ($p > 0.05$) и нижа је од активности FUA екстракта, поређење се мора узети са резервом јер су у испитивању коришћене различите концентрације екстраката и референтне супстанце.

Приликом *in vitro* испитивања инхибиције активности ензима COX-2 коришћене су исте концентрације екстраката као и код претходног испитивања инхибиције активности COX-1, дакле 50 μg/mL. Оба екстракта биљке *F. hexapetala* показала су значајан проценат инхибиције активности COX-2 ензима, па је FHA је имао 51.56% инхибиције док је FHR инхибирао активност COX-2 за 52.51%. Приближна вредност инхибиције COX-2 забележена је и код FUA екстракта (46.43%, $p > 0.05$). С друге стране, најнижи инхибиторни ефекат на активност ензима COX-2 имао је екстракт корена *F. ulmaria*, са више него дупло нижим степеном инхибиције (20.20%) у односу на остале екстракте ($p < 0.05$). Селективни инхибитор COX-2 ензима NS-398 је у концентрацији од 5 μM инхибирао активност COX-2 за 40.42%. Ова вредност је нешто нижа у односу на инхибицију COX-2 коју су имали екстракти FHA, FHR и FUA, али као што је био случај код претходног испитивања, коришћене концентрације екстраката и стандардне компоненте су тешко упоредиве. Из тог разлога може се рећи да екстракти у концентрацији од 50 μg/mL имају приближну COX-2 инхибиторну активност као и стандард NS-398 у концентрацији од 5 μM.

Из *Табеле 5.10.* може се видети да екстракти надземних делова обе испитиване биљке имају завидан степен инхибиције у односу на референтне инхибиторе, како COX-1, тако и ензима COX-2, при чему се и екстракт корена *F. hexapetala* показао као одличан инхибитор ензима COX-2.

Резултати испитивања инхбиције експресије COX-2 гена у THP-1 макрофагима дати су у *Табели 5.10*. Испитивана концентрација свих екстраката била је 25 μg/mL. Као референтни инхибитор експресије COX-2 гена коришћен је дексаметазон, стероидни лек за терапију запаљенских стања, у концентрацији од 2.5 nM. Екстракти FUA и FUR испољили су слаб ефекат на експресију COX-2 гена, са процентом инхибиције 10.19 и 8.54%, редом. Екстракти *F. hexapetala* нису показали значајну инхибицију експресије COX-2 гена. FHA је имао врло мали утицај, са инхибицијом од 4.45%, док је екстракт корена FHR био неактиван, са негативним процентом инхибиције експресије COX-2 гена.

Узимајући у обзир све добијене резултате, екстракти биљке *F. ulmaria*, првенствено FUA, показали су нешто виши ниво инхибиције у односу на оба екстракта *F. hexapetala*. Дексаметазон је испољио знатно виши ниво инхибиције експресије COX-2 гена (40.90%, $p < 0.05$). Стога, јасно се може видети да сви испитивани екстракти имају знатно нижи инхибиторни ефекат у поређењу са референтном компонентом.

Табела 5.10. In vitro антиинфламаторна активност екстраката биљака F. ulmaria и F. hexapetala и стандардних компоненти, изражена у процентима инхибиције (%) ензимске активности и експресије гена

*Екстракти и стандарди**	Инхибиција активности COX-1 (%)	Инхибиција активности COX-2 (%)	Инхибиција експресије COX-2 гена (%)
FUA	62.84 ± 3.76[а]	46.43 ± 3.85[а, б]	10.19 ± 6.52[а]
FUR	32.11 ± 3.20[б]	20.20 ± 4.19[в]	8.54 ± 5.26[а]
FHA	59.49 ± 4.91[а, г]	51.56 ± 5.29[а]	4.45 ± 17.74[а]
FHR	13.12 ± 4.45[в]	52.51 ± 2.69[а]	-11.03 ± 18.36[а]
Индометацин	49.63 ± 1.73[г]	-	-
NS-398	-	40.72 ± 1.89[б]	-
Дексаметазон	-	-	40.90 ± 5.62[б]

Резултати су изражени као средња вредност четири независна мерења ± С.Д. ($n = 4$). Вредности у колони означене различитим словима у суперскрипту се статистички значајно разликују на $p < 0.05$.
* Концентрација екстраката $c = 50$ μg/mL, индометацина $c = 1.25$ μM, NS-398 $c = 5$ μM, дексаметазона $c = 2.5$ nM. –, није тестирано.

5.8.2. In vivo антиинфламаторна активност

5.8.2.1. Антиноцицептивна активност

Тест вруће плоче се често користи како би се у *in vivo* условима одредила аналгетска (антиноцицептивна) активност испитиваних узорака. Овим тестом одређиван је антиноцицептивни ефекат екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* коришћењем експерименталих животиња, албино пацова из соја Wistar. Пацови су третирани екстрактима у две различите концентрације (100 и 200 mg/kg) у току три дана, док је једна група третирана референтним антиинфламаторним леком индометацином (10 mg/kg) и једна група је дефинисана као негативна контрола (без икаквог третмана). Мерено је време (у секундама – *s*) које животиња проведе на врућој плочи до тренутка када подигне задњу шапу. Ефекат испитиваних екстраката на реакцију латенције и проценат инхибиције одговора на бол изазван повишеном температуром подлоге приказан је у *Табели 5.11.*

Третман животиња екстрактима биљке *F. ulmaria* довео је до пораста времена латенције на термално изазивање бола у поређењу са негативном контролом, при чему су генерално веће вредности забележене код група животиња третираних екстрактом надземног дела (FUA) у обе концентрације. Група којој је аплициран управо овај екстракт у нижој концентрацији (FUA, 100 mg/kg) показала је највиши степен антиноцицепције (132 s, 25.71% инхибиције) у односу на остале групе третиране *F. ulmaria* екстрактима. Ове вредности су биле приближно једнаке испољеној антиноцицептивној активности индометацина у концентрацији 10 mg/kg (134 s, 27.62%). Доза од 200 mg/kg FUA екстракта код животиња је довела до краћег времена одговора на бол у односу на нижу дозу истог екстракта. Екстракт корена *F. ulmaria* у обе дозе (100 и 200 mg/kg) није показао значајнија одступања у мереном временском интервалу одговора на бол, у поређењу са негативном контролом ($p > 0.05$).

Табела 5.11. Резултати испитивања антиноцицептивне активности екстраката F. ulmaria и F. hexapetala у две различите дозе (100 и 200 mg/kg т.м.) на експерименталне животиње у тесту вруће плоче, у односу на негативну контролу и индометацин (10 mg/kg т.м.)

Третман	*Реакција латенције (s)*	*Инхибиција (%)*
Негативна контрола	105 ± 2.89	–
Индометацин (10 mg/kg)	134 ± 6.35	27.62
FUA (100 mg/kg)	132 ± 5.78	25.71
FUA (200 mg/kg)	117 ± 4.62	11.43
FUR (100 mg/kg)	108 ± 2.31	2.86
FUR (200 mg/kg)	110 ± 5.20	4.76
FHA (100 mg/kg)	147 ± 14.02	40.00
FHA (200 mg/kg)	152 ± 10.11	44.76
FHR (100 mg/kg)	158 ± 18.33$^{*,\#}$	50.48
FHR (200 mg/kg)	144 ± 10.54	37.14

Резултати су изражени као средња вредност мерења шест животиња у групи ± С.Д. ($n = 6$).
Вредности се статистички значајно разликују на $*p < 0.05$ у поређењу са негативном контролом и $\#p < 0.05$ поређено са позитивном контролом (индометацин).

Администрација екстракта надземног дела биљке *F. hexapetala* у две различите дозе (100 и 200 mg/kg) изазвала је дозно зависан пораст времена латенције. FHA екстракт у нижој концентрацији (100 mg/kg) показао је значајан аналгетски ефекат (147 s) са инхибицијом одговора од 40% у односу на негативну контролу. Претретман са истим екстрактом у дупло вишој дози значајно је продужио реакцију латенције до 152 s, што је за 44.76% више у односу на животиње из нетретиране групе. Код пацова третираних обема дозама FHA екстракта инхибиција одговора на термално индукован бол била је израженија у односу, не само на негативну, већ и на групу третирану индо-

метацином. Поред надземног дела *F. hexapetala*, утицај екстракта корена ове биљке на експерименталне животиње огледао се у високом степену инхибиције одговора на бол – антиноцицепције, који је забележен при обе примењене концентрације. Посебно значајан је био третман нижом дозом FUR екстракта (100 mg/kg) који је индуковао најдужи временски одговор на термални стимулус у поређењу са свим осталим групама, негативном контролом и индометацин-третираном групом ($p < 0.05$), а који је износио 158 s односно 50.48% инхибиције.

5.8.2.2. Антиедематозна активност

Антиинфламаторна активност биљних врста које су предмет ове докторске дисертације испитивана је у *in vivo* условима методом карагенан-индукованог едема (отока) у задњој десној шапи пацова. Антиедематозна активност екстраката (FUA, FUR, FHA и FHR), аплицираних у две концентрације 100 и 200 mg/kg/дан т.м., *p.o.*, по дану, и индометацина (10 mg/kg т.м., *p.o.*, по дану), као референтног антиинфламаторног лека, у периоду од три дана, одређивана је на основу способности испитиваног узорка да смањи едем шапе у одређеном временском периоду. Запремина третиране шапе мерена је на нултом времену и та вредност је коришћена за поређење са новоизмереним запреминама у наредном временском периоду, што значи да је за сваку животињу коришћена јединствена базална вредност. Временски интервал мерења је дефинисан на почетку на 2 сата (0, 2, 4 и 6 h) и последње мерење запремине шапице извршено је 24 h након апликације карагенана.

Ефекат метанолних екстраката биљака *F. ulmaria* (FUA и FUR) и *F. hexapetala* (FHA и FHR) на акутну инфламацију индуковану карагенаном изражен је у процентима повећања запремине третиране шапе (услед развијања едема) у односу на почетну (базалну) измерену запремину, а резултати су дати у *Табели 5.12.* и графички приказани на *Слици 5.14. (А и Б)*.

Локална инфламаторна реакција у задњој десној шапи пацова изазвана је инјектирањем карагенана, тај тренутак је означен као нулто време и касније мерења запремине шапа била су дефинисана у односу на нулто време. У позитивној контролној групи (I), која је претходно третирана само физиолошким раствором, већ на другом сату од тренутка аплицирања карагенана проценат пораста запремине едема је био значајан, док је на 4 h запремина едематозне шапе достигла свој максимум (106.33%). Након 6 h, проценат повећања едема у контролној групи I и даље је био значајно висок и одржао је приближну запремину све до краја експеримента, односно до мерења на 24 h након инјектирања карагенана. С друге стране, група II која је претходно третирана референтним антиинфламаторним леком индометацином (10 mg/kg) акутна инфламација индукована карагенаном је значајно смањена ($p < 0.05$) већ на другом сату мерења (2.89%), у поређењу са позитивном контролом (група I). Максимално повећање едема код животиња из групе II забележено је, као и код претходне групе, на 4 h након аплицирања карагенана. Међутим, инхибиција развијања едема шапе је била прилично висока, што се види по знатно нижим процентуалним вредностима за повећање едема

(20.08%) у односу на групу I ($p < 0.05$). Све до мерења на 24 h, вредности запремине едема су опадале, при чему је крајња вредност била виша за само 5.81% у односу на почетну запремину шапе.

Третман експерименталних животиња са екстрактима биљке *F. ulmaria*, у обе концентрације (100 и 200 mg/kg) у току три узастопна дана, резултовао је значајном редукцијом запремине едема у периоду од 24 h након инјектирања карагенана, у поређењу са позитивном контролом ($p < 0.05$).

Табела 5.12. Резултати испитивања антиедематозног потенцијала екстраката F. ulmaria и F. hexapetala у две различите дозе (100 и 200 mg/kg т.м.) на експерименталне животиње, у односу на позитивну контролу и индометацин (10 mg/kg т.м.)

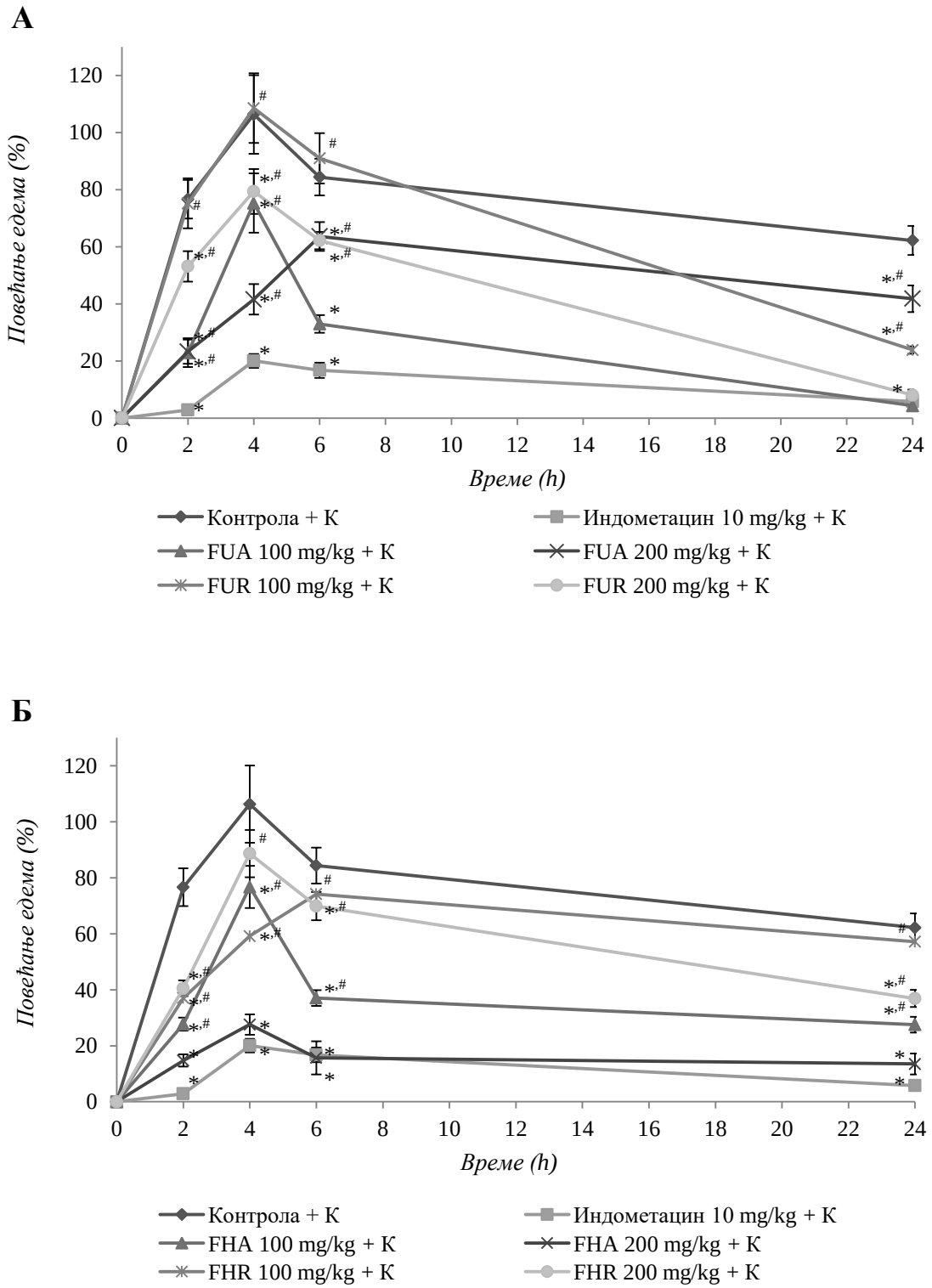
Група	*Третман*	*Пораст едема шапе (%)*			
		2 h	*4 h*	*6 h*	*24 h*
I	Позитивна контрола	76.65 ± 6.74	106.33 ± 13.76	84.40 ± 6.43	62.20 ± 5.11
II	Индометацин (10 mg/kg)	2.89 ± 0.52*	20.08 ± 2.43*	16.76 ± 2.64*	5.81 ± 1.49*
III	FUA (100 mg/kg)	22.94 ± 5.02*,#	75.30 ± 10.37*,#	32.96 ± 3.09*,#	4.35 ± 1.23*
IV	FUA (200 mg/kg)	23.28 ± 4.21*,#	41.60 ± 5.30*	63.63 ± 5.07*,#	41.81 ± 4.67*,#
V	FUR (100 mg/kg)	75.21 ± 8.74#	108.54 ± 12.22#	90.98 ± 8.85#	23.87 ± 1.30*,#
VI	FUR (200 mg/kg)	53.15 ± 5.32*,#	79.39 ± 7.84*,#	62.20 ± 3.05*,#	8.05 ± 1.99*
VII	FHA (100 mg/kg)	27.77 ± 2.35*,#	76.77 ± 7.56*,#	37.08 ± 2.81*,#	27.55 ± 2.80*,#
VIII	FHA (200 mg/kg)	14.76 ± 1.62*	27.61 ± 4.01*	15.69 ± 1.47*	13.50 ± 0.98*
IX	FHR (100 mg/kg)	37.08 ± 2.21*,#	59.22 ± 3.62*,#	74.23 ± 5.89#	57.22 ± 3.74#
X	FHR (200 mg/kg)	40.55 ± 2.80*,#	88.66 ± 8.41#	69.93 ± 5.04*,#	36.88 ± 3.07*,#

Резултати су изражени као средња вредност мерења осам животиња у групи ± С.Д. ($n = 8$).
Вредности се статистички значајно разликују на $*p < 0.05$ у поређењу са позитивном контролом и $\#p < 0.05$ поређено са групом третираном индометацином.

Као што се на *Слици 5.14. А* може видети, FUA екстракт примењен у обе дозе (у *Табели 5.12.* групе III и IV) приликом мерења на 2 h довео је до значајне редукције процента повећања едема, у одосу на контролну групу ($p < 0.05$). На четвртом сату након изазивања едема, група третирана са 100 mg/kg FUA достигла је максимум повећања едема (75.30%), а потом се запремина шапе смањивала све до краја задатог времена мерења. Тако да је након 24 h просечна запремина третираних шапа у датој групи била за само 4.35% већа у односу на базалну (почетну) запремину, што се статистички не разликује значајно, поредећи са ефектима референтног НСАИЛ индометацина ($p > 0.05$). Група третирана већом дозом FUA екстракта (200 mg/kg) имала је нешто другачије резултате након 4 h од индуковања инфламације. На четвртом сату

мерења, два пута већа доза FUA је скоро дупло успорила развој едема, у поређењу са нижом дозом, али је максимум пораста едема забележен на 6 h и износио је 63.63%, што је нижи проценат у односу на групу третирану дупло мањом концентрацијом истог екстракта. После 24 h од аплицирања карагенана, већа доза FUA екстракта није била у стању да значајно смањи развијени едем. Екстракт корена биљке *F. ulmaria* у дози од 100 mg/kg (група V) није испољио антиедематозни ефекат у првих 6 h од изазивања инфламације, а пораст запремине едема шапе био је у рангу са вредностима позитивне контроле (група I). Међутим, овај третман је успео да, након 24 h, смањи запремину едематозне шапе на 23.87% од почетне. У групи VI, третираној FUR екстрактом у дози 200 mg/kg проценат повећања запремине шапе у почетном периоду није био значајно редукован, у односу на контролну групу, а пораст едема је достигао свој максимум на 4 h (79.39%). Од четвртог сата едем се смањивао, да би на крају експеримента (24 h) запремина шапе била за 8.05% већа од почетне, што је приближно добијеним вредностима за индометацин ($p > 0.05$).

Антиинфламаторни ефекат метанолних екстраката *F. hexapetala* (FHA и FHR), у поређењу са позитивном контролом и активношћу индометацина, приказан је ради лакше прегледности добијених резултата на *Слици 5.14. Б*, одвојено од претходних група. Измерени проценти повећања едема шапе код ових група (VII – X) у растућем временском интервалу (2, 4, 6 и 24 h), у односу на нетретирану групу и групу којоја је добијала индометацин, дати су у *Табели 5.12*. Што се тиче групе претретиране екстрактом надземног дела *F. hexapetala* (FHA), у дози 100 mg/kg, резултати промене запремине шапе пацова прате сличан тренд као и код групе III, третиране екстрактом надземног дела *F. ulmaria* у истој дози. Код групе VII на 2 h од аплицирања карагенана просечно повећање запремине шапе било је 27.77%, док је на 4 h едем достигао свој максимум 76.77% (што је ниже за око 30% у односу на позитивну контролу). У наредном временском периоду забележено је значајно смањење едема, при чему је на 24 h FHA примењен у мањој дози редуковао проценат до 27.55%, што се статистички значајно разликује од вредности у позитивној контроли ($p < 0.05$). Најизраженију антиинфламаторну активност показао је управо овај екстракт – FHA, чија је концентрација у третману била 200 mg/kg. Не само што је ова доза екстракта на 2 h од инјектирања карагенана успела да спречи значајан пораст запремине шапе (14.76%), већ је и максимални едем на 4 h одржан на минимуму (27.61%). Након достизања максималне вредности запремине, едем се све до краја временског интервала мерења смањивао, при чему су све измерене вредности биле приближне резултатима групе третиране индометацином ($p > 0.05$), а статистички значајно различите од позитивне контроле ($p < 0.05$). Екстракт корена *F. hexapetala* (FHR), примењен у обе концентрације (100 и 200 mg/kg) успео је да, у односу на позитивну контролу, у одређеној мери смањи запремину едема 2 h након изазивања инфламаторне реакције у шапи. У групи третираној са 100 mg/kg FHR (група IX), максимум запремине едематозне шапе забележен је на 6 h (74.23%), али се едем до краја задатог времена није значајно смањио. Третман FHR екстрактом у дози 200 mg/kg (група X), такође није био ефикасан у већој мери, па је максимум пораста запремине шапе од 88.66% достигнут на 4 h. Наког тога, вредности су се смањивале све до 36.88% на 24 h.



Слика 5.14. Проценат повећања едема у односу на време протекло од изазивања едема код експерименталних животиња третираних екстрактима F. ulmaria (А) и F. hexapetala (Б) у поређењу са јединственим вредностима негативне (само карагенан) и позитивне контроле (индометацин и карагенан).

К – карагенан. Резултати су изражени као средња вредност мерења осам животиња у групи ± С.Д. (n = 8). Вредности се статистички значајно разликују на *$p < 0.05$ у поређењу са позитивном контролом и #$p < 0.05$ поређено са групом третираном индометацином.

Поређењем свих резултата, са најевидентнијим антиинфламаторним ефектом истичу се групе третиране екстрактима надземних делова обе испитиване биљке. Прецизније, FUA и FHA екстракти у нижој примењеној концентрацији (100 mg/kg) испољили су изванредне резултате у спречавању инфламаторног одговора у едематозном ткиву. И поред тога, најизраженију антиинфламаторну активност демонстрирао је FHA екстракт у дози од 200 mg/kg, која је упоредива са активношћу индометацина у концентрацији 10 mg/kg ($p > 0.05$).

5.9. Нефропротективна и хепатопротективна активност екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

5.9.1. Промена телесне масе експерименталних животиња и промена у маси испитиваних органа

Просечна телесна маса експерименталних животиња се на почетку експеримента кретала око 250 ± 20 g по животињи. Након десетодневног третмана са унапред дефинисаним дозама екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* (100, 200 и 400 mg/kg т.м.) и изазивања токсичности једном дозом цисплатине (7.5 mg/kg т.м.) петог дана третмана, животиње су жртвоване, а непосредно пре жртвовања измерена им је телесна маса. Резултати промене телесне масе животиња третираних *F. ulmaria* екстрактима дати су процентуално у односу на почетну масу у *Табели 5.13.*, док су исти резултати за третман са *F. hexapetala* екстрактима приказани у *Табели 5.14*. Такође, одмах по жртвовању животиња, маса испитиваних органа (бубрега и јетри) је измерена и израчунати су односи маса органа у односу на крајњу телесну масу пацова (*Табеле 5.13.* и *5.14.*). На основу резултата датих у *Табели 5.13.* се може констатовати да је повећање просечне телесне масе пацова третираних FUA и FUR екстрактима на крају експеримента варирало од 19.70 – 50.88% (групе III-X), а вредност промене за негативну (нетретирану) контролну групу била је 31.37%. Супротно овоме, просечна телесна маса код животиња из позитивне контроле, односно групе II третиране само цисплатином, повећана је за само 6.23%, а разлика ове вредности у односу на негативну контролу, али и све остале групе животиња, била је на нивоу значајности $p < 0.05$. На основу ових података, примећује се да су FUA и FUR екстракти побољшали унос хране и ресорпцију нутритијената код животиња третираних цисплатином, у односу на групу где је она самостално примењивана. Такође, животиње које су конзумирале само FUR екстракт имале су значајније повећање телесне масе у односу на нетретирану контролну групу.

Позитивна контрола (група II) у експерименту са екстрактима биљке *F. hexapetala* имала је пораст телесне масе за само 5.60%, што значи да је и у овом случају цисплатина утицала на нормалну исхрану и раст пацова (*Табела 5.14.*). Остале групе

третиране FHA и FHR екстрактима и цисплатином имале су повећање телесне масе од 9.72 – 20.00%, што је нешто мање у односу на кореспондентне групе третиране *F. ulmaria* екстрактима. Код група третираних само највећом дозом *F. hexapetala* екстраката (групе IX и X) забележено је најзначајније повећање масе пацова, преко 30 одсто, што је знатно више, не само од CP-третиране групе, већ и у односу на негативну контролу (група I, $p < 0.05$).

Што се тиче односа између телесне масе и масе бубрега и јетри експерименталних животиња, у оба случаја нису постојале значајније варијације у групама, које би указивале на неку абнормалност.

5.9.2. Биохемијски параметри у серуму експерименталних животиња

У сврху утврђивања нивоа нормалне функције и степена оштећења бубрега и јетре животиња третираних цисплатином (CP), испитан је ниво биохемијских параметара у серуму чија се неуобичајена количина или активност повезује са стањима токсичности и поремећаја у раду поменутих органа. На основу резултата биохемијских тестова у серумима експерименталних животиња може се одредити ниво смањења функције и дијагностификовати степен реналних и хепатобилијарних промена. Биохемијски маркери нормалног функционисања бубрега изабрани за испитивање су уреа (U), креатинин (CRE) и мокраћна киселина (UA). Што се тиче биохемијских маркера функционисања јетре испитана је ензимска активност аланин трансаминазе (ALT), аспартат трансаминазе (AST), алкалне фосфатазе (ALP) и гама глутамил трансферазе (γGT). Поред тога, у серумима је квантификована и количина укупних протеина (TP).

Утицај екстраката биљке *F. ulmaria* (FUA и FUR) у третману са цисплатином на параметре серума експерименталних животиња представљен је у *Табели 5.13*. Ниво укупних протеина у серуму за групу третирану само цисплатином (група II, 63.44 g/L) је био значајно нижи ($p < 0.05$) у односу на негативну контролу (група I), као и у односу на све преостале групе пацова третиране цисплатином и FUA и FUR екстрактима у три различите дозе (100, 200 и 400 mg/kg т.м.). Једини изузетак била је група VII, третирана цисплатином и 200 mg/kg FUR екстракта, са количином укупних протеина 64.43 g/L, што није статистички значајно од CP-третиране групе ($p > 0.05$). Резултати испитиваних биохемијских параметара нормалне функције бубрега (уреа, креатинин и мокраћна киселина) у серуму указују да су нивои ових параметара значајно повишени у позитивној контроли, третираној само цисплатином ($p < 0.05$), у односу на негативну контролу. Евидентно је да инјектирање једне дозе цисплатине доводи до пораста концентрације, како урее и мокраћне киселине, тако и креатинина који је један од најбитнијих показатеља абнормалне функције бубрега, што даље указује на изражену нефротоксичност цисплатине. Третман FUA екстрактом смањио је концентрацију урее и креатинина у дозно зависном маниру, док је FUR екстракт успео да значајно смањи концентрацију ових параметара, при чему је највећа доза (400 mg/kg, група VIII) била

најмање ефикасна. Исти тренд је забележен и за концентрацију мокраћне киселине, па је FUR у најнижој дози у најмањем проценту смањио ниво серумске UA, што је случај и са FUA екстрактом. Поред тога, третмани животиња само са 400 mg/kg екстраката FUA и FUR (групе IX и X), без апликације циплатине, проузроковали су повећање испитиваних функционалних параметара бубрега, које је ипак било статистички значајно различито ($p < 0.05$) у односу на негативну контролу, осим у случају креатинина у групи IX.

Поред јасних доказа оштећења бубрега изазваних апликацијом цисплатине у позитивној контролној групи, серумски параметри нормалне функције јетре (ALT, AST, ALP и γGT) су показали да цисплатина има и изражен хепатотоксични ефекат. Одређивањем биохемијских параметара функције јетре добијени су резултати (*Табела 5.13.*) који откривају да су ензимске активности ALT, AST, ALP и γGT у серуму пацова који чине позитивну контролну групу (третираних само цисплатином) биле значајно увећане ($p < 0.05$) у поређењу са негативном контролом. У поменутој позитивној контроли вредности за активност ензима ALT, ALP и γGT (U/L) биле су дупло, или чак више него дупло, увећане у односу на нетретирану групу. Третман екстрактима надземног дела и корена биљке *F. ulmaria* резултовао је смањењем активности трансаминаза (ALT и AST), у не толико строгом дозно зависном односу. Третман са највишом дозом екстракта FUR (400 mg/kg т.м.) уз апликацију цисплатине (група VIII) снизио је активност ALT и AST до нивоа забележеног у негативној контроли, и још ниже у случају ензимске активности AST. Животиње које су добијале само FUA и FUR екстракте у највишој дози (групе IX и X) показале су сличне ($p > 0.05$) или чак ниже (у случају AST при апликацији FUA, $p < 0.05$) вредности ензимске активности свих испитаних ензима, у поређењу са негативном контролом.

Табела 5.13. Телесна маса, тежински однос бубрега и јетре у односу на телесну масу (т.м.) пацова третираних екстрактима биљке F. ulmaria (FUA и FUR) и цисплатином (CP) и ефекат третмана на биохемијске параметре серума пацова[а]

Групе[б]	Промена телесне масе (%)	Тежински однос бубрег/т.м × 1000	Тежински однос јетра/т.м. × 1000	TP (g/L)	*Биохемијски параметри бубрега*			*Биохемијски параметри јетре*			
					UR (mmol/L)	CRE (μmol/L)	UA (μmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	γGT (U/L)
I	31.37 ± 1.34	8.84 ± 1.87	30.31 ± 4.62	74.22 ± 3.45	6.20 ± 0.62	43.96 ± 1.08	53.17 ± 4.99	59.99 ± 1.85	124.81 ± 8.68	95.11 ± 5.65†	43.11 ± 4.51
II	6.23 ± 2.42*	9.09 ± 1.55	33.41 ± 3.09	63.44 ± 0.42*	9.10 ± 1.11*	51.00 ± 4.52*	94.8 ± 7.00*	95.66 ± 5.21*	156.27 ± 5.32*	193.63 ± 10.32*	90.65 ± 6.87*
III	37.25 ± 3.24†	8.06 ± 0.93†	47.99 ± 5.62†	68.23 ± 3.09†	7.62 ± 1.13†	50.77 ± 3.66	84.25 ± 5.42†	79.01 ± 3.41†	143.17 ± 4.69†	147.01 ± 5.68†	55.27 ± 5.11†
IV	33.33 ± 1.68†	7.69 ± 0.50†	49.70 ± 2.75	67.25 ± 2.64†	7.07 ± 0.87†	47.57 ± 2.74†	84.20 ± 4.06†	61.98 ± 2.60†	142.88 ± 4.65†	156.45 ± 8.59†	53.06 ± 7.08†
V	19.70 ± 2.06†	8.39 ± 1.06	38.53 ± 4.06†	66.29 ± 1.14†	6.95 ± 0.62†	44.47 ± 2.08†	86.90 ± 3.33†	64.60 ± 3.44†	137.50 ± 6.92†	156.26 ± 11.35†	50.85 ± 4.63†
VI	50.88 ± 3.38†	8.39 ± 1.21	38.57 ± 2.84†	68.30 ± 3.27†	6.70 ± 0.77†	47.95 ± 3.22†	74.30 ± 6.25†	76.82 ± 1.32†	137.06 ± 7.20†	169.85 ± 13.87†	67.43 ± 4.92†
VII	38.60 ± 3.41†	8.29 ± 1.34	41.54 ± 1.30	64.43 ± 3.06	5.45 ± 1.06†	46.15 ± 3.41†	74.10 ± 7.09†	71.62 ± 3.38†	135.31 ± 7.32†	166.45 ± 9.63†	63.63 ± 3.88†
VIII	26.67 ± 3.65†	9.44 ± 1.08	47.54 ± 3.14†	77.71 ± 2.84†	8.75 ± 1.20	48.80 ± 1.78†	75.90 ± 4.79†	63.73 ± 2.66†	119.60 ± 11.01†	151.16 ± 12.02†	64.86 ± 6.41†
IX	32.61 ± 1.98†	7.85 ± 1.13†	43.67 ± 2.68*†	71.16 ± 2.27†	7.45 ± 0.51*†	49.40 ± 0.99†	71.00 ± 3.80*†	69.76 ± 2.83*†	96.03 ± 15.87*†	107.29 ± 14.40†	47.91 ± 4.06†
X	42.00 ± 5.22*†	6.95 ± 1.62†	37.91 ± 2.93*†	69.77 ± 3.69†	7.75 ± 0.44*†	46.00 ± 2.11*†	74.75 ± 3.29*†	62.93 ± 13.54†	103.21 ± 9.56*†	89.45 ± 16.33†	44.22 ± 4.13†

[а] Резултати су изражени као средња вредност ± С.Д., n = 5 животиња у групи;

[б] I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FUA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FUA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FUA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FUR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FUR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FUR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FUA 400 mg/kg т.м.; X - FUR 400 mg/kg т.м.;

$^{*}p < 0.05$ у поређењу са негативном контролном групом;

$^{\dagger}p < 0.05$ у поређењу са позитивном контролном групом (CP).

Табела 5.14. Ефекат екстраката биљке F. hexapetala (FHA и FHR) и цисплатине (CP) на телесну масу, тежински однос јетре и бубрега у односу на телесну масу (т.м.) пацова и биохемијске параметре серума пацова[а]

Групе[б]	Промена телесне масе (%)	Тежински однос бубрег/т.м × 1000	Тежински однос јетра/т.м. × 1000	TP (g/L)	*Биохемијски параметри бубрега*			*Биохемијски параметри јетре*			
					UR (mmol/L)	CRE (μmol/L)	UA (μmol/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	γGT (U/L)
I	27.33 ± 3.12	8.61 ± 0.12	29.32 ± 1.24	66.51 ± 5.60	6.50 ± 0.30	42.8 ± 1.00	50.05 ± 3.75	56.45 ± 2.81	135.61 ± 10.49	64.54 ± 7.81†	49.38 ± 16.92
II	5.60 ± 1.01*	8.80 ± 0.32	32.96 ± 2.03*	60.05 ± 2.08	9.10 ± 2.70*	49.5 ± 1.51*	86.90 ± 3.62*	91.66 ± 6.98*	172.85 ± 25.31*	179.47 ± 13.62*	124.18 ± 24.53*
III	9.72 ± 2.32†	8.02 ± 0.21†	28.25 ± 3.67†	65.13 ± 11.58	6.55 ± 0.75†	49.9 ± 7.81	54.90 ± 12.10†	55.87 ± 1.99†	107.09 ± 16.32†	102.09 ± 11.14†	34.15 ± 4.30†
IV	20.00 ± 2.48†	9.64 ± 0.34†	31.71 ± 4.05	71.15 ± 13.01†	7.62 ± 0.40†	54.7 ± 2.65†	54.05 ± 9.05†	67.22 ± 2.32†	142.01 ± 12.26†	125.69 ± 11.09†	54.72 ± 5.97†
V	10.67 ± 1.64†	8.35 ± 0.42	33.32 ± 2.86	74.22 ± 4.23†	7.72 ± 1.40†	55.65 ± 6.25†	50.01 ± 8.33†	55.59 ± 2.14†	104.76 ± 18.04†	127.19 ± 10.67†	36.48 ± 6.79†
VI	12.35 ± 2.75†	8.28 ± 0.28†	41.33 ± 3.49†	70.31 ± 1.59†	7.71 ± 1.00†	52.80 ± 4.60†	65.50 ± 9.90†	51.79 ± 3.87†	153.65 ± 17.46†	131.07 ± 14.54†	58.96 ± 6.21†
VII	14.81 ± 3.62†	8.31 ± 0.17	34.38 ± 4.65	70.21 ± 6.13†	9.00 ± 0.15	52.55 ± 2.65†	52.25 ± 2.85†	69.84 ± 2.43†	103.30 ± 19.36†	129.08 ± 8.77†	17.19 ± 2.36†
VIII	12.35 ± 2.83†	8.48 ± 0.35	38.06 ± 3.87†	74.65 ± 3.38†	8.25 ± 0.55†	53.70 ± 0.70†	57.95 ± 3.75†	53.83 ± 2.24†	131.82 ± 19.76†	119.18 ± 1.98†	38.32 ± 4.06†
IX	35.71 ± 4.61*†	7.75 ± 0.49*†	39.33 ± 2.74*†	69.47 ± 0.52†	8.75 ± 0.95*†	49.75 ± 0.95*	60.00 ± 1.80*†	41.03 ± 1.56*†	98.81 ± 13.51*†	98.51 ± 6.82*†	17.93 ± 3.89*†
X	30.43 ± 3.59†	8.33 ± 0.31	43.52 ± 2.33*†	68.43 ± 0.77†	8.90 ± 0.10*	51.20 ± 0.70*	73.20 ± 0.40*†	51.51 ± 2.10†	97.77 ± 10.16*†	108.70 ± 2.91*†	38.59 ± 3.31*†

[а] Резултати су изражени као средња вредност ± С.Д., $n = 5$ животиња у групи;

[б] I - Негативна контролна група; II - цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FHA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FHA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FHA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FHR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FHR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FHR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FHA 400 mg/kg т.м.; X - FHR 400 mg/kg т.м.;

$^{*}p < 0.05$ у поређењу са негативном контролном групом;

$^{\dagger}p < 0.05$ у поређењу са позитивном контролном групом (CP).

У *Табели 5.14.* представљени су резултати биохемијских параметара серума животиња које су третиране екстрактима надземног дела и корена биљке *F. hexapetala* (FHA и FHR) уз апликацију једне дозе цисплатине (7.5 mg/kg т.м.), као токсичног агенса. Ефекат различитих доза примењених екстраката (100, 200 и 400 mg/kg т.м.) је евидентан код свих тестираних параметара. Након само једне апликације цисплатине, активности ензима AST, ALT, ALP и γGT у серуму животиња из позитивне контроле (група II) су значајно порасле ($p < 0.05$) у односу на негативну контролу (група I). Такође, као и у претходном случају, приметан је утицај цисплатине на параметре нормалне функције бубрега. Концентрације урее и мокраћне киселине су биле знатно увећане у групи II, у поређењу са нетретираном групом ($p < 0.05$), док је ниво укупних протеина био значајно смањен.

Третман пацова екстрактима FHA и FHR редуковао је ензимску активност трансаминаза, ALP и γGT, као и концентрацију урее и мокраћне киселине ($p < 0.05$), у односу на позитивну контролу (група II). Међутим, примећено је да је, у свим групама пацова третираних екстрактима биљке *F. hexapetala* уз изазивање токсичности цисплатином, количина креатинина била нешто повећана у односу на обе контролне групе, и негативну и позитивну. У групама које су третиране само са ова два екстракта, у највећој дози (400 mg/kg), уочава се значајно смањење активности AST и γGT ($p < 0.05$), док у случају укупних протеина екстракти нису умногоме променили њихов ниво ($p > 0.05$) у поређењу са серумима нетретираних животиња (група I). На ове резултате надовезују се и резултати биохемијских параметара функције бубрега у поменутим групама које су третиране највишом дозом екстраката *F. hexapetala*, па је тако у групама IX и X повећан ниво урее и мокраћне киселине ($p < 0.05$) у поређењу са негативном контролом.

5.9.3. Параметри оксидативног стреса у ткиву бубрега и јетре експерименталних животиња

Ефекти екстраката биљке *F. ulmaria* (FUA и FUR) на параметре оксидативног стреса (CAT, SOD, GSH и TBARS) у ткивима бубрега и јетре при интоксикацији експерименталних животиња са једном дозом цисплатине приказани су на *Слици 5.15*. Услед третмана цисплатином (група II) значајно је смањена активност ензима CAT и SOD у реналном ткиву и у ткиву јетре ($p < 0.05$; *Слика 5.15. А и Б*) у поређењу са негативном контролом.

У односу на групу II, апликација екстраката *F. ulmaria* у три различите концентрације (100, 200 и 400 mg/kg т.м.) довела је до повећања активности CAT и SOD ($p < 0.05$). Штавише, оба екстракта (FUA и FUR) индуковала су пораст ензимске активности поменутих антиоксидативних ензима у дозно зависном односу, са највишом измереном активношћу у групама које су третиране највишом дозом екстраката од 400 mg/kg (групе V и VIII). Овај пораст ензимске активности у поменутим групама се догађа и у бубрежном и у хепатичком ткиву, али је знатно израженији у бубрезима. У

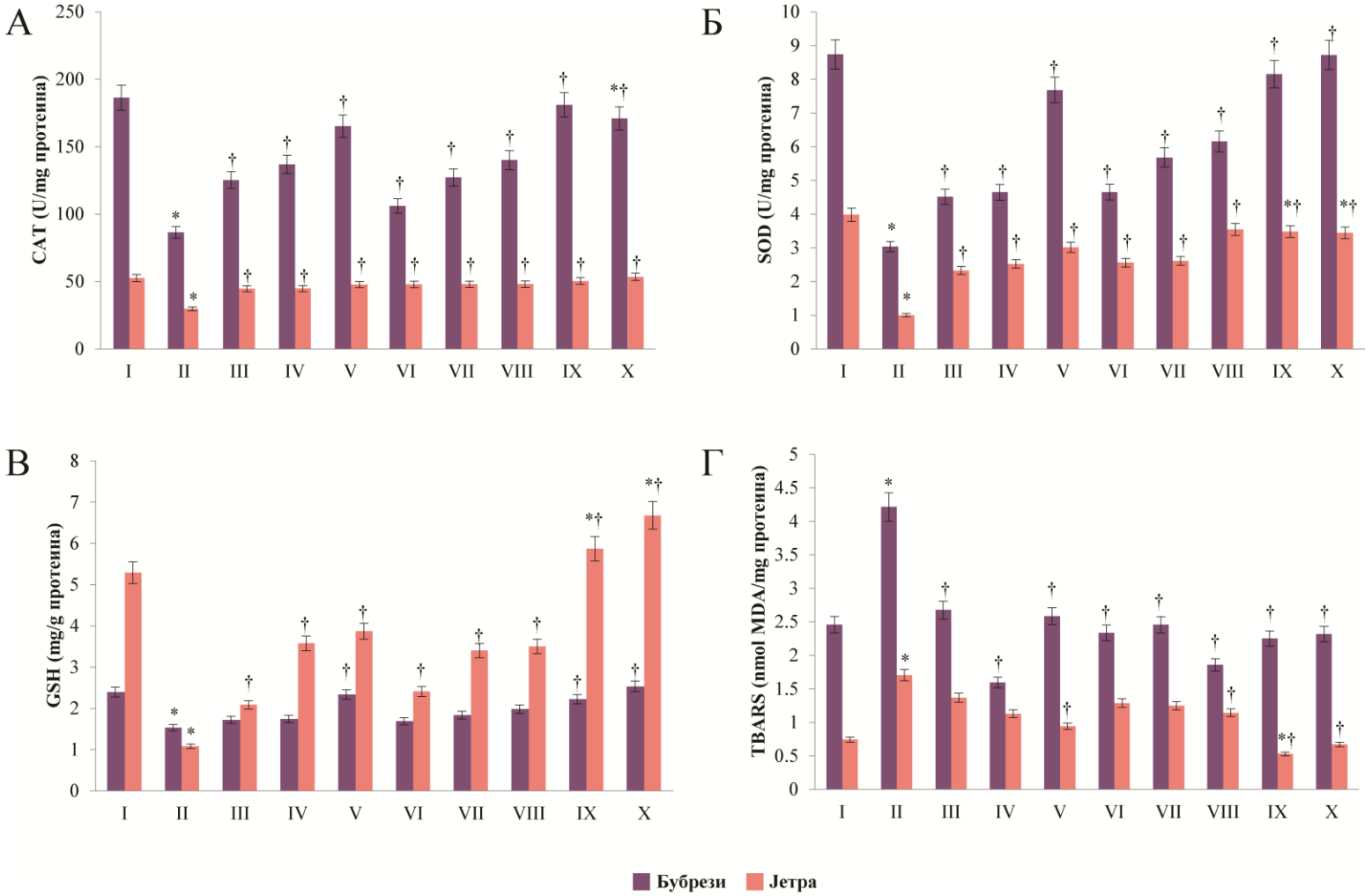
групама које су примале само екстракте у највишој дози, активности CAT и SOD у оба испитивана органа су биле врло сличне као код негативне контролне групе ($p > 0.05$).

Концентрација редукованог глутатиона (GSH), у ткиву бубрега и јетри код групе третиране само цисплатином, била је јако ниска (*Слика 5.15.B*) и прилично измењена у односу на негативну контролу – групу I ($p < 0.05$). Што се тиче утицаја FUA и FUR на концентрацију GSH у бубрезима, екстракти су незнатно и дозно зависно повећали ниво GSH, али је значајнија разлика ($p < 0.05$) у односу на позитивну контролу (група II) примећена само код групе V, третиране FUA екстрактом у највећој дози (400 mg/kg). С друге стране, третман екстрактима FUA и FUR је у значајној мери дозно зависно одржао виши ниво GSH у ткиву јетре ($p < 0.05$) у поређењу са позитивном контролом. Такође, у групама које су третиране само FUA и FUR екстрактима у дози 400 mg/kg забележен је повећан ниво GSH у јетри, са вишим вредностима, чак и у односу на негативну контролу.

Ниво TBARS у бубрежном ткиву изражено је смањен услед котретмана наведеним екстрактима ($p < 0.05$), у поређењу са ефектима саме цисплатине. У двема групама третираним само екстрактима у највишој дози (групе IX и X), концентрација TBARS је била приближна вредностима добијеним за негативну контролну групу. У ткиву јетре, оба екстракта *F. ulmaria* су дозно зависно редуковала концетрацију TBARS (*Слика 5.15.Г*), али је значајнији ефекат у односу на позитивну контролу ($p < 0.05$) био присутан само уз третман највишом дозом екстраката.

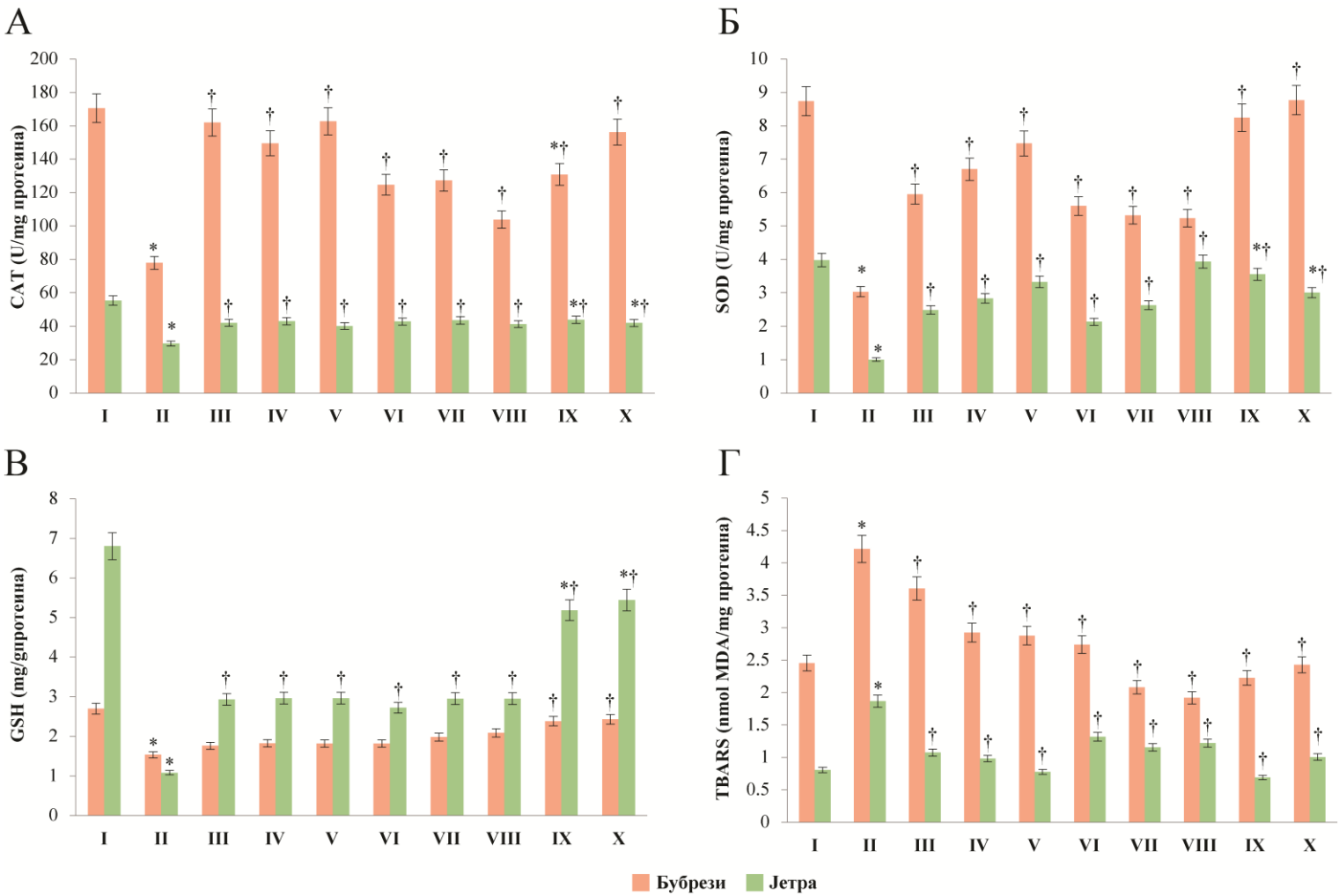
Утицај различитих доза екстраката *F. hexapetala* на ензимску активност CAT и SOD, као и на концентрацију GSH и TBARS у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана презентован је на *Слици 5.16*. Као што је потврђено и у претходном случају, цисплатина је индуковала значајно снижавање активности CAT и SOD, као и смањење концентрације GSH у ткиву бубрега и јетре, у поређењу са негативном контролом ($p < 0.05$). Параметри липидне пероксидације у испитиваним органима (TBARS) су такође били увећани у већ наведеној групи третираној само једном дозом цисплатине (група II).

Третман екстрактима биљке *F. hexapetala* (FHA и FHR) је знатно превенирао смањење ензимске активности и концентрације GSH у бубрежном ткиву. Повећање активности CAT и SOD у бубрезима је запажено посебно код група третираних цисплатином у комбинацији са FHA екстрактом, нарочито у концентрацији 400 mg/kg т.м. (*Слика 5.16. А и Б*). Активност антиоксидативних ензима у групама третираним FHR екстрактом, иако незанемарљива, била је статистички значајно различита у односу на позитивну контролу ($p < 0.05$).



Слика 5.15. Утицај екстраката F. ulmaria на параметре оксидативног стреса у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана: А – каталаза (CAT), Б – супероксид дисмутаза (SOD), В – редуковани глутатион (GSH) и Г – параметри липидне пероксидације (TBARS).

I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FUA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FUA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FUA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FUR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FUR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FUR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FUA 400 mg/kg т.м.; X - FUR 400 mg/kg т.м. Резултати су изражени као средња вредност ± С.Е.М., $n = 5$ животиња у групи; $^{*}p < 0.05$ у поређењу са негативном контролном групом; $^{\dagger}p < 0.05$ у поређењу са позитивном контролном групом (CP).



Слика 5.16. Утицај екстраката F. hexapetala на параметре оксидативног стреса у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана: А – каталаза (CAT), Б – супероксид дисмутаза (SOD), В – редуковани глутатион (GSH) и Г – параметри липидне пероксидације (TBARS).

I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FHA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FHA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FHA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FHR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FHR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FHR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FHA 400 mg/kg т.м.; X - FHR 400 mg/kg т.м. Резултати су изражени као средња вредност ± С.Е.М., $n = 5$ животиња у групи; $^{*}p < 0.05$ у поређењу са негативном контролном групом; $^{\dagger}p < 0.05$ у поређењу са позитивном контролном групом (CP).

Поред тога, висока активност CAT и SOD у реналном ткиву примећена је у групама третираним само екстрактима *F. hexapetala* у највишој дози од 400 mg/kg, са вредностима које статистички нису значајно различите ($p > 0.05$) у односу на негативну контролу (група I). Једини изузетак чини активност бубрежне CAT у групи третираној само са FHA (400 mg/kg), која је била знатно другачија у односу и на негативну и на позитивну контролу ($p < 0.05$). Што се тиче ткива јетре, највиша активност CAT измерена је у групама третираним средњом дозом оба екстракта (200 mg/kg т.м.). У групама третираним са екстрактима *F. hexapetala* и цисплатином, активност SOD у хепатичком ткиву расла је дозно зависно као што је приказано на *Слици 5.16.Б*. Активности оба ензима, у хомогенатима јетри животиња из група третираних само највишом дозом екстраката, биле су убедљиво више у односу на CP-третирану групу ($p < 0.05$), али у исто време и статистички другачије ($p < 0.05$) у поређењу са негативном контролом.

Као што се може видети на *Слици 5.16.В*, концентрација GSH у бубрезима животиња третираних само цисплатином била је прилично смањена у односу на негативну контролу ($p < 0.05$). У групама које су, поред цисплатине, добијале и екстракте *F. hexapetala* ниво GSH у бубрезима је незнатно увећан, али не и статистички значајно у односу на CP-третирану групу ($p > 0.05$). Групе које су добијале само екстракте FHA и FHR у највишој дози у бубрежном ткиву су имале знатно већу концентрацију GSH, што се статистички знатно разликовало од CP-третиране групе ($p < 0.05$), али не и од негативне контроле ($p > 0.05$). Што се тиче концентрације GSH у јетрама CP-третиране групе, била је, као што је већ речено, знатно снижена у односу на негативну контролу, али је третман екстрактима *F. hexapetala* изазвао значајан пораст концентрације GSH ($p < 0.05$) у односу на позитивну контролу.

Као што је приказано на *Слици 5.16.Г*, третман цисплатином проузроковао је висок степен липидне пероксидације у бубрезима и јетри који се огледа у изразито повишеној концентрацији TBARS. Највиша доза FHA и, поготово, FHR екстракта (400 mg/kg) проузроковала је значајно смањење ($p < 0.05$) концентрације TBARS у бубрезима, док је у погледу хепатичког ткива знатно ефикаснији био FHA екстракт. Дакле, у групама третираним FHA екстрактом примећено је изразито опадање нивоа TBARS ($p < 0.05$) у односу на позитивну контролу третирану искључиво цисплатином.

5.9.4. Хистопатолошко испитивање препарата ткива бубрега и јетре експерименталних животиња

Целуларна архитектура на ткивним пресецима бубрега и јетри експерименталних животиња, третираних екстрактима биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* где је токсичност изазвана цисплатином, испитивана је хистопатолошки под микроскопом након хематоксилин-еозин (H & E) бојења. Свака промена морфолошких параметара је забележена и резултати интензитета промена су описани као: одсуство промена (−), промене благог интензитета (+); промене средњег интензитета (++) и изражене промене (+++).

Ефекти третмана екстрактима биљке *F. ulmaria* на смањење хистолошких оштећења бубрега и јетри пацова изазваних једном дозом цисплатине дати су у *Табели 5.15.*, а репрезентативне фотографије хистопатолошких промена у морфологији бубрежног и хепатичког ткива приказане су на *Сликама 5.17.* и *5.18*. Фотографије су посматране под оригиналним увећањем ×40 или ×100, а изабране су на основу заједничких и најзаступљенијих промена забележених у једној групи пацова.

На ткивним пресецима реналног ткива животиња третираних само цисплатином (група II) примећен је широк дијапазон промена са израженим интензитетом, као што су конгестија, хидропсна дегенерација тубуларног епитела, атрофија гломерула и проширење субкапсуларних простора, некроза и десквамација тубуларног епитела, едем и крварење у интерстицијуму, езинофилни материјали у лумену тубула, док су интерстицијална фиброза и запаљенски инфилтрат у интерстицијуму били средњег интензитета (*Табела 5.15.*). Код ткивних пресека бубрега из негативне контроле (група I) уочена је нормална ткивна архитектура (*Слика 5.17.I*), са незнатним променама типа интерстицијалног едема и конгестије. Код група пацова третираних екстрактима FUA и FUR у три различите дозе (100, 200 и 400 mg/kg) примећено је значајно смањење оштећења патолошке природе изазваних цисплатином, посебно код оштећења тубуларних ћелија и промена у интерстицијуму и на гломерулима. FUA и FUR једино нису успели да у већој мери редукују дегенерацију и десквамацију тубуларног епитела, као и некрозу епителних ћелија тубула. Када говоримо о овим мофролошким променама у бубрежном ткиву, примећено је да су оба екстракта *F. ulmaria*, примењени у највишим дозама (400 mg/kg, групе V и VIII) уз једну дозу циплатине, чак утицали на повећање интензитета промена тубуларног епитела (десквамација и некроза). Такође, код група које су третиране само FUA и FUR екстрактима у највећој концентрацији (400 mg/kg, групе IX и X) забележено је развијање појединих промена благог до умереног интензитета, од којих је најзапаженија била атрофија гломерула и проширење субкапсуларних простора, као и умерена некроза и десквамација тубуларног епитела.

Хепатичко ткиво животиња из контролне групе имало је нормалну ћелијску структуру (*Слика 15.8.I*), уз благу конгестију у појединим узорцима. Прегледом ткивних пресека јетре пацова из групе третиране само цисплатином (група II, *Табела 5.15., Слика 15.8.II*) уочени су јасни знаци нарушавања морфолошких параметара јетре, са приметно израженом конгестијом, балонском дегенерацијом, инфилтрацијом ли-

мфоцита, леукоцита и макрофага, конфлуентном и фокалном некрозом и нешто мање израженом фиброзом и хиперплазијом Купферових ћелија. У групама III-V, третираним FUA екстрактом у три дозе, примећено је значајно побољшање хепатичке хистолошке структуре, у поређењу са CP-третираном групом. Једино је у групи IV, третираној са FUA екстрактом у концентрацији 200 mg/kg т.м., изостала значајнија промена у интензитету конгестије, некрозе (фокалне и конфлуентне) и балонске дегенерације, у односу на исте промене у групи II. Неки морфолошки параметри ткива јетре у групама VI-VIII, третираним са FUR екстрактом у три дозе и цисплатином, били су прилично изражени, посебно код највише концентрације екстракта (400 mg/kg). Поред тога, FUR екстракт у вишим концентрацијама изазвао је појаву фиброзе благог интензитета, што је примећено и код групе третиране само највишом дозом овог екстракта. Такође, оба екстракта *F. ulmaria*, аплицирана у поменутој концентрацији (400 mg/kg) без изазивања токсичности са цисплатином (групе IX и X), проузроковали су умерене хистопатолошке промене у ткиву јетре.

Добијени резултати хистопатолошке опсервације показују да администрација екстраката биљке *F. ulmaria* резултује побољшањем морфолошких параметара бубрега и јетре експерименталних животиња, у поређењу са значајним оштећењем ткива које изазива третман цисплатином. Најефикасније у спречавању или смањивању интензитета промена у структури ткива су биле ниже дозе екстраката *F. ulmaria*, које су успеле да у значајној мери очувају морфологију реналног и хепатичког ткива од утицаја цисплатине. Изузетак је забележен код третмана цисплатином и највишом концентрацијом испитиваних екстраката (400 mg/kg, групе V и VIII), где је очување структуре ткива у односу на CP-групу детектовано у малом обиму или није примећено уопште.

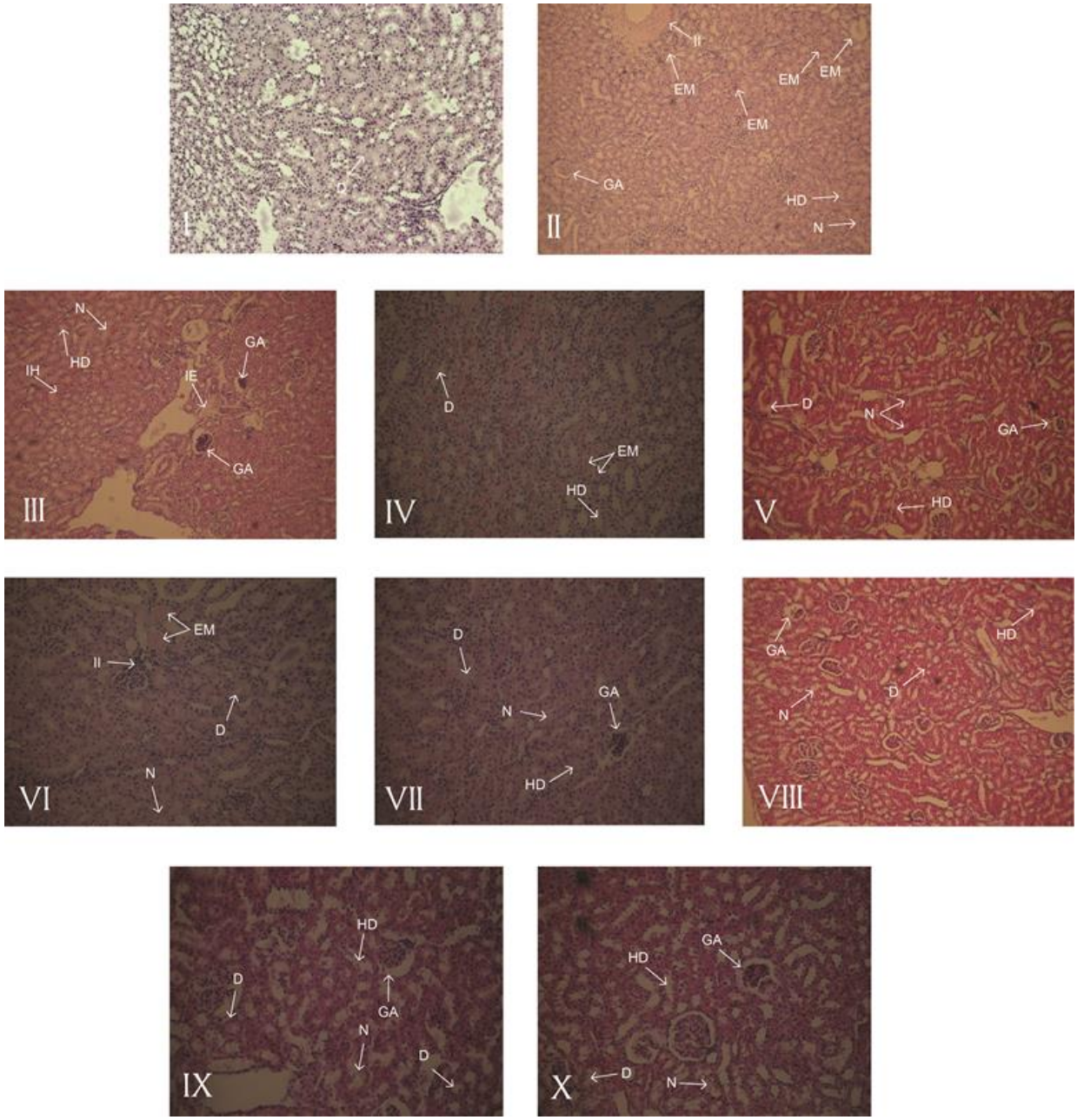
Табела 5.15. Ефекти екстраката F. ulmaria на морфолошке параметре у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана (n = 5) [а,б]

Групе[б]	*Хистопатолошки параметри бубрега*									
	Конгестија	Хидропсна дегенерација тубуларног епитела	Атрофија гломерула и проширење субкапсуларних простора	Интерстицијална фиброза	Запаљенски инфилтрат у интерстицијуму	Некроза тубуларног епитела	Интерстицијални едем	Интерстицијално крварење	Десквамација тубуларног епитела	Еозинофилни материјали у лумену тубула
I	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
II	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
III	++	++	++	+	+	++	+	+	++	+
IV	++	+++	++	+	-	+++	+	+	+++	+
V	++	+++	+++	-	-	+++	+	++	+++	++
VI	++	++	+	-	++	++	+	-	++	+
VII	++	++	+	-	-	++	+	-	++	+
VIII	++	++	++	-	++	+++	++	++	+++	++
IX	+	+	++	-	-	++	+	+	++	+
X	+	+	++	-	-	+	+	+	+	+

	Хистопатолошки параметри јетре						
	Конгестија	Конфлуентна некроза	Балонска дегенерација	Хиперплазија Купферових ћелија	Инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага	Фокална некроза	Фиброза
I	+ [а]	-	-	-	-	-	-
II	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
III	+	+	+	+	+	+	-
IV	+++	+++	+++	-	+	+++	-
V	++	+	++	+	+	+	-
VI	++	++	++	+	+	++	-
VII	++	+++	+++	++	+	+++	+
VIII	+++	+++	+++	+	++	+++	+
IX	++	++	++	+	+	++	-
X	++	++	++	+	+	++	+

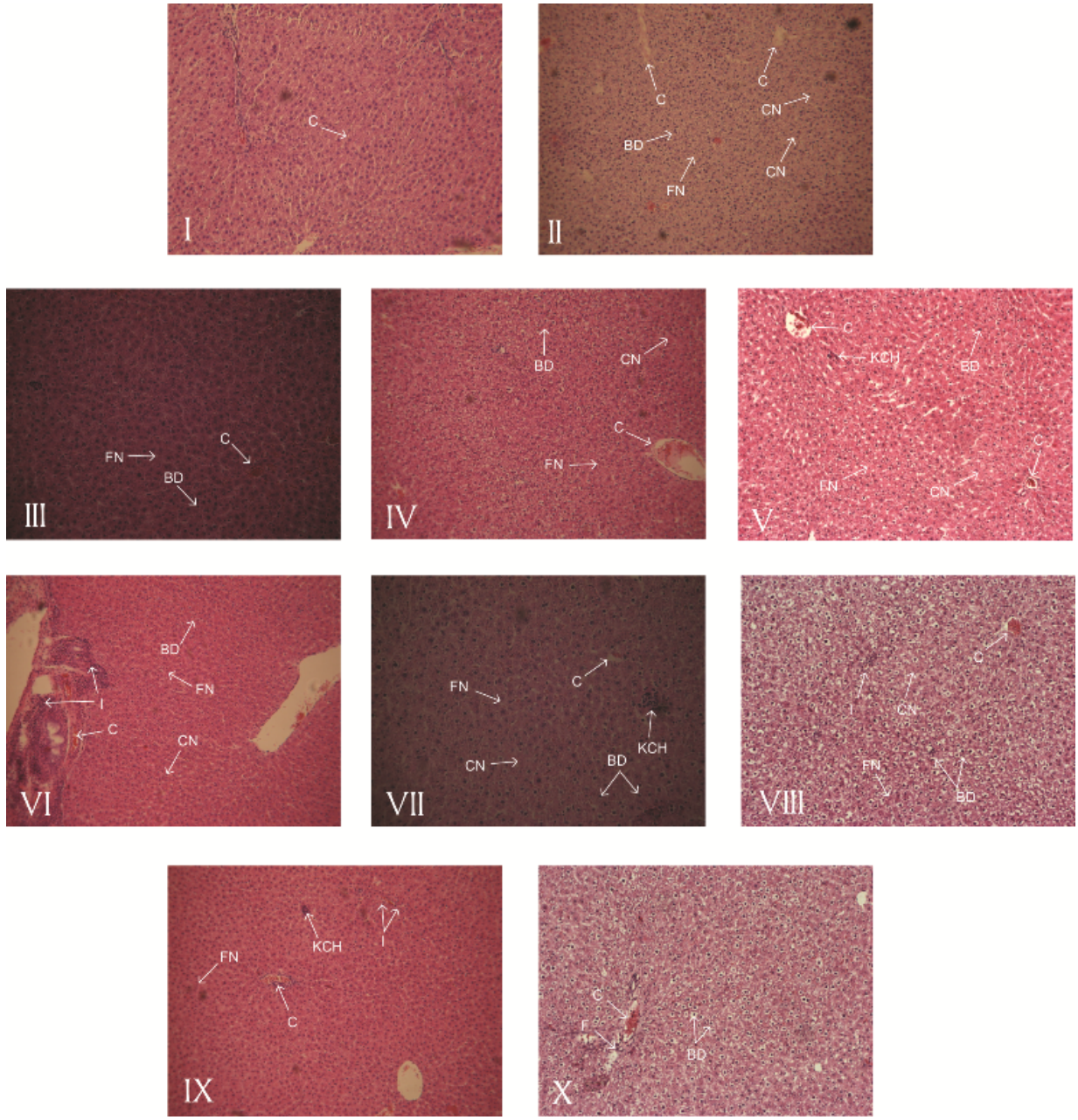
[а] Промене: (-), одсуство; (+), благе; (++), средње; (+++), изражене;

[б] I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FUA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FUA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FUA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FUR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FUR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FUR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FUA 400 mg/kg т.м.; X - FUR 400 mg/kg т.м.



Слика 5.17. Репрезентативне фотографије ткивних препарата бубрега пацова третираних екстрактима F. ulmaria и CP

I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FUA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FUA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FUA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FUR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FUR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FUR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FUA 400 mg/kg т.м.; X - FUR 400 mg/kg т.м.
Бојење H & E, оригинално увећање 40× или 100×.
Стрелице: **HD** – хидропсна дегенерација тубуларног епитела; **GA** – атрофија гломерула и проширење субкапсуларних простора; **II** – запаљенски инфилтрат у интерстицијуму; **N** – некроза тубуларног епитела; **IE** – интерстицијални едем; **IH** – интерстицијално крварење; **D** – десквамација тубуларног епитела; **EM** – еозинофилни материјали у лумену тубула.



Слика 5.18. Репрезентативне фотографије ткивних препарата јетри пацова третираних екстрактима F. ulmaria и CP

I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FUA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FUA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FUA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FUR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FUR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FUR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FUA 400 mg/kg т.м.; X - FUR 400 mg/kg т.м.
Бојење H & E, оригинално увећање 40× или 100×.
Стрелице: **C** – конгестија; **BD** – балонска дегенерација; **KCH** – хиперплазија Купферових ћелија; **I** – инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага; **FN** – фокална некроза; **CN** – конфлуентна некроза; **F** – фиброза.

Резултати микроскопског посматрања ткивних пресека бубрега и јетре експерименталних животиња, подвргнутих третману екстрактима биљке *F. hexapetala* и једној дози цисплатине, представљени су у *Табели 5.16.* Репрезентативне фотографије снимљене под оригиналним увећањем ×40 или ×100, са означеним хистопатолошким променама у ткиву бубрега и јетри, приказане су на *Сликама 5.19. и 5.20.*

На основу хистопатолошке опсервације, констатовано је да је на пресецима бубрежног ткива животиња из контролне групе (група I) присутна нормална ткивна архитектура, у неким случајевима са незнатном конгестијом и едемима у интерстицијуму (*Табела 5.16., Слика 5.19.I*). Такође, у неким узорцима у овој групи детектован је развитак десквамације и хидропсне дегенерације тубуларног епитела слабог интензитета. Као и у претходном случају, у реналном ткиву CP-третиране групе животиња детектоване су бројне хистопатолошке промене израженог интензитета. Третман цисплатином (група II) довео је до настанка дегенерисане структуре тубула са вакуолизацијом и губитком тубуларне архитектуре, уз изражено присуство еозинофилних материјала у лумену тубула. Такође, примећена је значајна конгестија, гломеруларна склероза и атрофија гломерула уз проширење субкапсуларних простора, као и интерстицијално крварење, едем и инфламаторни инфилтрат у ткиву бубрега. Третман екстрактима FHA и FHR у току 10 дана (100, 200 и 400 mg/kg т.м.) довео је до извесне превенције у настанку морфолошких промена у бубрезима. Иако ни у једној групи третираној екстрактима биљке *F. hexapetala* није забележено одсуство праћених патолошких промена, њихов интензитет је био значајно смањен у односу на CP-групу (*Слика 5.19.III-VIII*). На ткивним пресецима бубрега поменутих група (групе III-VIII) уочено је присуство умерених тубуларних и гломеруларних патолошких промена, с тим да је у групама које су добијале највећу дозу FHA и FHR екстраката (400 mg/kg) без аплицирања цисплатине (групе IX и X) примећено благо тубуларно и гломеруларно оштећење морфологије бубрега.

На пресецима ткива јетре животиња из контролне групе јасно се види нормална ткивна архитектура уз благу конгестију у неким узорцима (*Слика 5.20.I*). Једна доза цисплатине изазвала је у групи II значајно присуство конгестије, синусоидалне дилатације, балонске дегенерације праћене инфилтрацијом лимфоцита, леукоцита и макрофага, као и фокалне некрозе. Такође, забележена је хиперплазија Купферових ћелија и фиброза портних простора, обе умереног интензитета. Групе којима су даване три различите концентрације FHA и FHR екстраката одликовале су се значајним смањењем интензитета хистопатолошких промена у ткиву јетре. На основу резултата приказаних у *Табели 5.16.* може се закључити да је FHA екстракт примењен у дози 100 mg/kg т.м. показао значајну превенцију настанка оштећења јетре узрокованог уносом цисплатине. С друге стране, дупло већа доза FHR екстракта била је способна да смањи интензитет свих промена у ткиву јетре изазваних цисплатином, осим хиперплазије Купферових ћелија. Оно што свакако треба узети у обзир јесте да су, и у овом случају, оба екстракта примењена у највећој дози (400 mg/kg), без цисплатине, довела до формирања извесних структурних промена благог интензитета у ткиву јетре (групе IX и X).

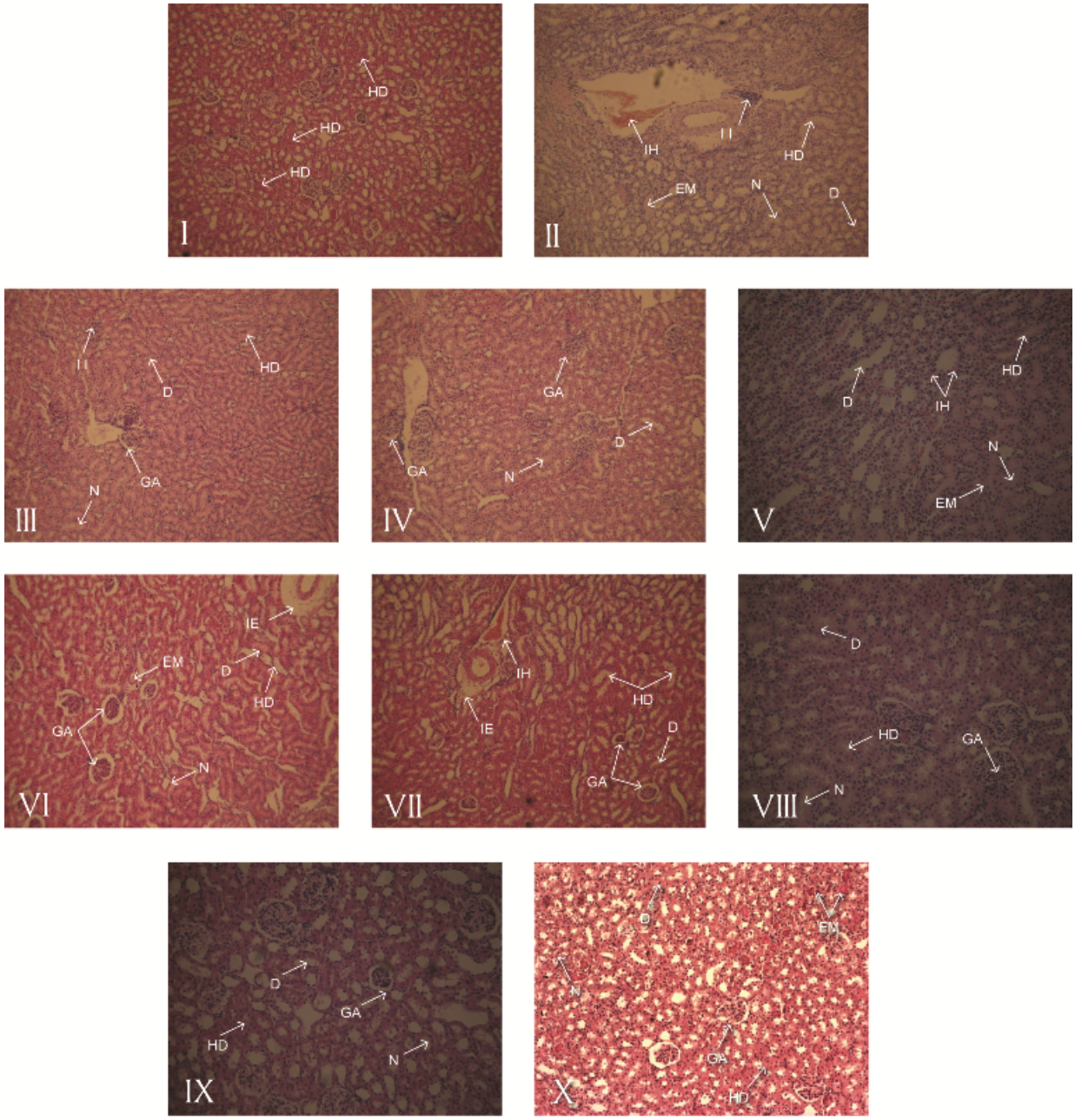
Табела 5.16. Ефекти екстраката F. hexapetala на морфолошке параметре у бубрезима и јетри пацова након CP-третмана (n = 5) [а,б]

Групе[б]	*Хистопатолошки параметри бубрега*									
	Конгестија	Хидропсна дегенерација тубуларног епитела	Атрофија гломерула и проширење субкапсуларних простора	Склероза гломерула	Запаљенски инфилтрат у интерстицијуму	Некроза тубуларног епитела	Интерстици-јални едем	Интерстици-јално крварење	Десквамација тубуларног епитела	Еозинофилни материјали у лумену тубула
I	+ [а]	+	-	-	-	-	+	-	+	-
II	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
III	++	++	+	+	+	+	++	++	++	++
IV	+	++	+	+	+	+	++	+	++	++
V	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++
VI	+	++	+	+	+	+	++	+	++	++
VII	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++
VIII	+	++	+	+	+	+	++	+	++	++
IX	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
X	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

	Хистопатолошки параметри јетре						
	Конгестија	Дилатација синусоида	Балонска дегенерација	Хиперплазија Купферових ћелија	Инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага	Фокална некроза	Фиброза
I	+	-	-	-	-	-	-
II	+++	+++	+++	++	+++	+++	++
III	+	+	+	+	+	+	-
IV	++	++	+	++	++	++	+
V	++	++	++	+	+	+	+
VI	++	++	++	++	++	++	-
VII	+	+	+	++	+	+	-
VIII	++	++	++	++	++	++	+
IX	+	+	++	+	+	+	-
X	+	+	++	+	+	+	-

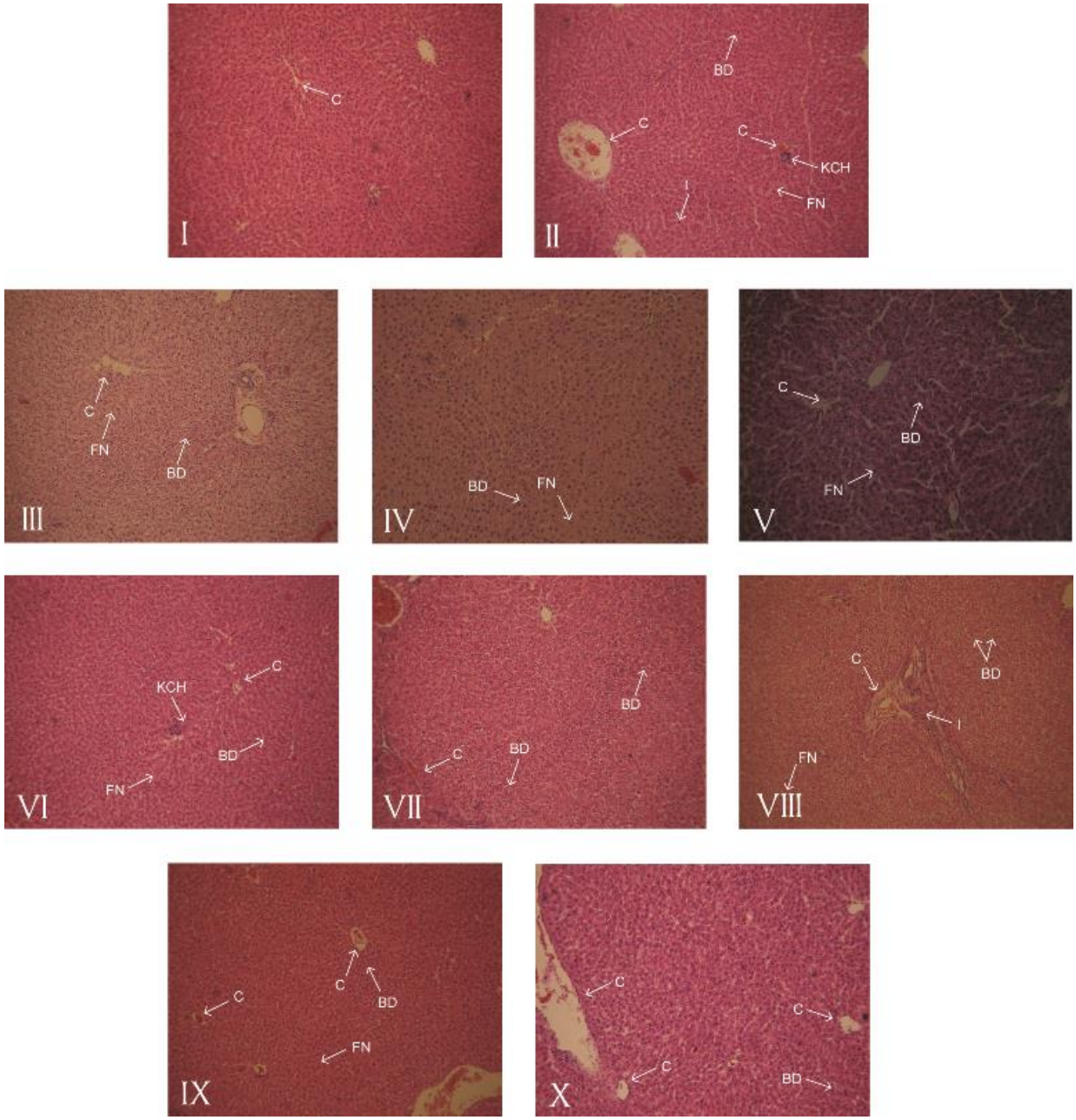
[а] Промене: (-), одсуство; (+), благе; (++), средње; (+++), изражене;

[б] I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FHA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FHA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FHA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FHR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FHR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FHR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FHA 400 mg/kg т.м.; X - FHR 400 mg/kg т.м.



Слика 5.19. Репрезентативне фотографије ткивних препарата бубрега пацова третираних екстрактима F. hexapetala и CP

I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FHA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FHA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FHA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FHR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FHR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FHR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FHA 400 mg/kg т.м.; X - FHR 400 mg/kg т.м.
Бојење H & E, оригинално увећање 40× или 100×.
Стрелице: **HD** – хидропсна дегенерација тубуларног епителa; **GA** – атрофија гломерула и проширење субкапсуларних простора; **II** – запаљенски инфилтрат у интерстицијуму; **N** – некроза тубуларног епителa; **IE** – интерстицијални едем; **IH** – интерстицијално крварење; **D** – десквамација тубуларног епителa; **EM** – еозинофилни материјали у лумену тубула.



Слика 5.20. Репрезентативне фотографије ткивних препарата јетри пацова третираних екстрактима F. hexapetala и CP

I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FHA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FHA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FHA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FHR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FHR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FHR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FHA 400 mg/kg т.м.; X - FHR 400 mg/kg т.м.
Бојење H & E, оригинално увећање 40× или 100×.
Стрелице: **C** – конгестија; **BD** – балонска дегенерација; **KCH** – хиперплазија Купферових ћелија; **I** – инфилтрација лимфоцита, леукоцита и макрофага; **FN** – фокална некроза.

5.9.5. Генотоксичност и антигенотоксично деловање

Генотоксичност и способност екстраката да смање оштећење ДНК, настало деловањем цисплатине у бубрезима и јетри, испитана је коришћењем алкалне верзије Комет теста. При томе су резултати представљени у класама „комета“ које настају као последица оштећења молекула ДНК у ћелији. Класе су означене бројевима од 0 до 4, где 0 указује да нема оштећења ДНК, 1 да је оштећење минимално и класа 2 да је присутан средњи степен оштећења ДНК, док су класе 3 и 4 дефинисане као максимално оштећење ДНК молекула. Како би се испитали гено- и антигенотоксични ефекти екстраката обе биљке које су предмент ове докторске дисертације, након жртвовања експерименталних животиња у претходном испитивању нефро- и хепато-протективне активности, делови оба органа су одвојени за коришћење у Комет тесту.

Резултати расподеле класа комета, укупан скор оштећења ДНК у ћелијама бубрега и јетре изазваног апликацијом цисплатине, као и проценат редукције оштећења (%R) применом екстраката надземног дела и корена биљке *F. ulmaria* (FUA и FUR) приказани су у *Табели 5.17*.

На основу класификације комета, оштећење ДНК у ћелијама бубрега у негативној контролној групи било је на нивоу класа 0 и 1, што значи да су ланци ДНК били без или са минималним оштећењем. Што се тиче генотоксичности цисплатине на нивоу бубрега, она је деловала као мутагени агенс и испољила је изразиту генотоксичност са присутним свим класама оштећења комета и укупним скором 205.2. Осетно смањење CP-индукованог оштећења ДНК забележено је у бубрезима пацова третираних са оба екстракта *F. ulmaria* у најнижој дози (100 mg/kg т.м.). Проценат редукције оштећења ДНК био је 67.3% за FUA и 88.6% за FUR, у односу на позитивну контролу (група II). Администрација FUR екстракта у концентрацији 200 mg/kg утицала је на смањење генотоксичности цисплатине за 38.2%, док FUA екстракт у истој дози није био толико успешан (19.05%).

Анализа оштећења ДНК након третмана екстрактима FUA и FUR у концентрацији од 400 mg/kg и цисплатином показала је да третман нема значајнијег утицаја на смањење CP-изазваног оштећења ДНК, са процентом редукције испод 10% у односу на позитивну контролу (8.4 и 8.9%, редом). Овоме доприносе и резултати генотоксичности у бубрезима добијени за групе IX и X, које су третиране само екстрактима у највишој дози (без цисплатине). Ту се јасно уочава велики проценат комета распоређених у класама 1, 2 и 3 (у односу на негативну контролу), а у случају FUA екстракта чак и у класи 4, која је претходно забележена само код позитивне контроле. Свеобухватним тумачењем резултата види се да концентрација екстраката итекако утиче на ниво ДНК оштећења. Па тако, у групама III и VI, третираним екстрактима *F. ulmaria* у најнижој концентрацији од 100 mg/kg, присутне су неоштећене (класа 0) и минимално оштећене (класе 1 и 2) бубрежне ћелије, без оштећења које би припадало класама 3 и 4. Умерено оштећење (класа 3) се појавило код ћелија у групама које су третиране са оба екстракта у концентрацијама 200 и 400 mg/kg, док је максимално оштећење ДНК у бубрезима (класа 4) примећено само код групе животиња третиране цисплатином и

групе IX која је, као што је већ поменуто третирана само FUA екстрактом у концентрацији од 400 mg/kg.

Резултати који указују на оштећење ДНК у ћелијама јетре животиња третираних цисплатином (7.5 mg/kg, *i.p.*) и екстрактима *F. ulmaria*, такође су дати у *Табели 5.17*. Интраперитонеална апликација цисплатине, без додатног третмана екстрактима, довела је до оштећења ДНК у ћелијама јетре, где се комете могу сврстати у класе 1, 2 и 3, а постоје и максимална оштећења која припадају класи 4. Укупни скор поменутог оштећења ДНК хепатоцита био је 177.7.

Примена FUA и FUR екстраката у дози од 100 mg/kg уз третман цисплатином, није проузроковала значајнија оштећења ланаца ДНК. Посебно треба истаћи третман FUR екстрактом (100 mg/kg, група VI), где је укупни скор оштећења био сличан као код негативне контролне групе и тиме доказан протективни ефекат овог екстракта на цисплатином индуковану генотоксичност ћелија јетре. Проценат редукције оштећења ДНК у јетри уз третман FUA и FUR (100 mg/kg) био је знатно виши (75.2 и 97.9%, редом) у односу на вредности добијене уз третман повећаним дозама ових екстраката.

Третман екстрактима у концентрацији 200 mg/kg није био толико ефикасан у смањењу оштећења ДНК, са кометама које се могу сврстати у класе 1 и 2, док максимална оштећења ДНК ланаца (класа 4) нису евидентирана. Тако је и третман екстрактима *F. ulmaria* у концентрацији 400 mg/kg био прилично неефикасан у снижавању %R, са вредностима 22.7% за FUA и 10.6% за FUR. Генотоксичност у ћелијама јетре самих екстраката *F. ulmaria* у највећој примењеној дози (400 mg/kg) корелира са претходно образложеним резултатима генотоксичности у ћелијама бубрега. У групама IX и X утицај екстраката на оштећење ДНК није био занемарљив и примећена је значајна разлика ($p < 0.05$) у учесталости оштећења ДНК хепатоцита у односу на негативну контролну групу.

Ипак, за све групе третиране FUA и FUR екстрактима средње вредности скора ДНК оштећења у јетри биле су ниже у односу на одговарајуће вредности групе третиране само цисплатином. Поред тога, највећи број комета се могао сврстати у класу 1 која представља минимално оштећење, док је једино код позитивне контроле забележено присуство комета из класе 4, односно максимално оштећених ланаца ДНК.

Најизраженији антигенотоксични потенцијал, на нивоу и ћелија бубрега и ћелија јетре, испољили су екстракти у најнижој концентрацији од 100 mg/kg, с тим што је виши проценат редукције оштећења ДНК (%R) евидентиран у третману наведеном дозом екстракта корена биљке *F. ulmaria* (88.6% у ћелијама бубрега и 97.9% у ћелијама јетре).

Табела 5.17. Генотоксични и антигенотоксични ефекти метанолних екстраката биљке F. ulmaria (FUA и FUR) у бубрезима и јетри пацова третираних цисплатином

Групе[б]	*Ниво оштећења ДНК у бубрезима*					Укупан скор[а]	%R[в]
	0	**1**	**2**	**3**	**4**		
I	71.2 ± 0.1	28.8 ± 0.4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	28.8 ± 0.1	/
II	0.00 ± 0.00	24.1 ± 1.2	55.2 ± 0.3	12.1 ± 0.8	8.6 ± 0.3	205.2 ± 0.3*	/
III	29.7 ± 0.6	54.1 ± 0.2	16.2 ± 0.3	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	86.5 ± 0.32*†	**67.3**
IV	7.7 ± 0.4	17.9 ± 0.5	69.3 ± 0.2	5.1 ± 0.3	0.00 ± 0.00	171.6 ± 0.4*†	**19.05**
V	0.00 ± 0.00	26.4 ± 1.1	56.6 ± 0.5	16.9 ± 0.21	0.00 ± 0.00	190.5 ± 0.12*†	**8.4**
VI	58.9 ± 0.4	33.4 ± 0.12	7.7 ± 1.2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	48.8 ± 0.32$^{\dagger *}$	**88.6**
VII	24.3 ± 0.35	33.3 ± 0.21	22.7 ± 0.9	19.7 ± 1.02	0.00 ± 0.00	137.9 ± 0.9*†	**38.2**
VIII	15.8 ± 0.12	15.8 ± 0.4	31.6 ± 1.1	36.8 ± 0.15	0.00 ± 0.00	189.4 ± 1.02*†	**8.9**
IX	9.5 ± 0.3	38.1 ± 0.51	33.3 ± 0.2	14.3 ± 1.01	4.8 ± 0.5	166.7 ± 0.9*†	
X	12.5 ± 0.20	20.0 ± 0.4	62.5 ± 0.53	5.0 ± 0.10	0.00 ± 0.00	160.0 ± 1.8*†	
	Ниво оштећења ДНК у јетри						
I	76.2 ± 0.3	23.8 ± 0.2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	23.8 ± 1.9	/
II	0.00 ± 0.00	53.2 ± 2.1	21.3 ± 1.3	20.2 ± 0.2	5.3 ± 0.3	177.7 ± 2.1*	/
III	54.8 ± 0.4	33.3 ± 0.2	7.24 ± 0.7	4.8 ± 0.4	0.00 ± 0.00	61.9 ± 0.2*†	**75.2**
IV	32.4 ± 0.00	35.1 ± 0.7	13.5 ± 0.8	18.9 ± 0.4	0.00 ± 0.00	118.8 ± 0.5*†	**38.3**
V	14.3 ± 0.3	35.7 ± 1.01	42.9 ± 0.13	7.1 ± 0.4	0.00 ± 0.00	142.8 ± 0.42*†	**22.7**
VI	76.9 ± 0.5	19.2 ± 1.1	3.8 ± 0.2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	26.9 ± 0.53†	**97.9**
VII	34.3 ± 1.2	37.1 ± 0.63	11.4 ± 1.3	17.1 ± 0.23	0.00 ± 0.00	111.2 ± 1.02*†	**43.2**
VIII	11.5 ± 0.23	34.7 ± 0.3	34.6 ± 1.2	19.2 ± 0.6	0.00 ± 0.00	161.4 ± 1.4*†	**10.6**
IX	25.8 ± 0.23	35.5 ± 0.53	20.9 ± 1.2	17.7 ± 0.3	0.00 ± 0.00	130.6 ± 0.72*†	
X	13.8 ± 0.11	37.9 ± 0.61	41.4 ± 0.34	6.9 ± 0.34	0.00 ± 0.00	141.4 ± 0.8*†	

[а] Резултати представљају средњу вредност ± С.Д., n = 5 животиња у групи;
[б] I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FUA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FUA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FUA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FUR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FUR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FUR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FUA 400 mg/kg т.м.; X - FUR 400 mg/kg т.м.;
[в] %R – проценат редукције оштећења ДНК; $^{*}p < 0.05$ у поређењу са негативном контролном групом; $^{\dagger}p < 0.05$ у поређењу са позитивном контролном групом (CP).

Резултати антигенотоксичног ефекта екстраката биљке *F. hexapetala* (FHA и FHR), у комбинацији са цисплатином као генотоксичним агенсом, на ћелије бубрега и јетре пацова, а у односу на већ поменуту нетретирану групу и групу третирану цисплатином дати су у *Табели 5.18*. Док је миграција ДНК видљиво увећана у групи која је примала само цисплатину у односу на негативну контролу, примена екстраката *F. hexapetala* у све три концентрације (100, 200 и 400 mg/kg) није довела до значајнијег

смањења оштећења ДНК изазваних цисплатином. Поред тога, након третмана само FHA и FHR екстрактима у највишој дози (400 mg/kg, групе IX и X), у ћелијама бубрега забележено је приметно оштећење ДНК ланаца са укупним скором нешто нижим од CP-третиране групе, али и статистички значајно различитим ($p < 0.05$) од негативне контроле (група I).

Табела 5.18. Генотоксични и антигенотоксични ефекти метанолних екстраката биљке F. hexapetala (FHA и FHR) у бубрезима и јетри пацова третираних цисплатином

Групе[б]	*Ниво оштећења ДНК у бубрезима*					Укупан скор[а]	%R[в]
	0	**1**	**2**	**3**	**4**		
I	71.2 ± 0.1	28.8 ± 0.4	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	28.8 ± 0.1	/
II	0.00 ± 0.00	24.1 ± 1.2	55.2 ± 0.3	12.1 ± 0.8	8.6 ± 0.3	205.2 ± 0.3*	/
III	0.00 ± 0.00	30.1 ± 1.2	50.5 ± 1.3	11.7 ± 0.6	7.8 ± 1.2	197.1 ± 1.1*	**4.6**
IV	0.00 ± 0.00	21.3 ± 0.5	55.1 ± 0.2	22.5 ± 0.3	1.1 ± 0.2	203.3 ± 0.5*	**1.1**
V	0.00 ± 0.00	3.9 ± 0.7	68.6 ± 0.8	25.5 ± 0.4	1.9 ± 0.3	225.5 ± 0.2*†	**/**
VI	0.00 ± 0.00	32.3 ± 0.7	58.1 ± 0.3	6.4 ± 1.2	3.2 ± 0.9	180.6 ± 1.2*†	**13.9**
VII	0.00 ± 0.00	32.9 ± 0.4	52.3 ± 1.1	10.3 ± 1.1	4.5 ± 1.3	186.4 ± 0.4*†	**10.7**
VIII	0.00 ± 0.00	19.4 ± 1.4	52.3 ± 1.5	16.4 ± 2.1	11.9 ± 2.2	220.8 ± 1.1*†	/
IX	11.1 ± 0.43	33.3 ± 0.17	37.1 ± 0.12	14.8 ± 0.4	3.7 ± 1.02	166.6 ± 0.32*†	
X	19.1 ± 0.23	19.1 ± 0.7	28.6 ± 0.43	33.3 ± 1.01	0.00 ± 0.00	176.2 ± 0.14*†	
	Ниво оштећења ДНК у јетри						
I	76.2 ± 0.3	23.8 ± 0.2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	23.8 ± 1.9	/
II	0.00 ± 0.00	53.2 ± 2.1	21.3 ± 1.3	20.2 ± 0.2	5.3 ± 0.3	177.7 ± 2.1*	/
III	0.00 ± 0.00	82.8 ± 1.2	13.8 ± 0.6	1.7 ± 1.2	1.7 ± 1.2	122.2 ± 0.8*†	**36.1**
IV	0.00 ± 0.00	79.3 ± 0.3	15.9 ± 1.1	3.2 ± 1.1	1.6 ± 0.6	126.8 ± 4.8*†	**33.1**
V	0.00 ± 0.00	70.1 ± 0.7	20.8 ± 0.2	7.8 ± 0.1	1.3 ± 0.7	140.2 ± 3.3*†	**24.4**
VI	0.00 ± 0.00	77 ± 1.4	16.4 ± 0.5	4.9 ± 0.4	1.7 ± 1.8	131.3 ± 2.1*†	**30.1**
VII	0.00 ± 0.00	71.2 ± 0.8	18.6 ± 0.3	6.8 ± 1.3	3.4 ± 1.4	142.3 ± 0.2*†	**23.0**
VIII	0.00 ± 0.00	59.5 ± 1.3	21.8 ± 0.8	15.8 ± 0.2	2.9 ± 0.3	162.5 ± 2.5*†	**9.9**
IX	31.3 ± 0.21	42.7 ± 0.81	16.7 ± 0.12	9.4 ± 0.7	0.00 ± 0.00	104.2 ± 1.01*†	
X	24.1 ± 0.15	48.2 ± 0.6	15.7 ± 0.53	12.05 ± 0.23	0.00 ± 0.00	115.7 ± 0.52*†	

[а] Резултати представљају средњу вредност ± С.Д., $n = 5$ животиња у групи;
[б] I – Негативна контролна група; II – цисплатина (CP) 7.5 mg/kg т.м., *i.p.*; III - FHA 100 mg/kg т.м. + CP; IV - FHA 200 mg/kg т.м. + CP; V - FHA 400 mg/kg т.м. + CP; VI - FHR 100 mg/kg т.м. + CP; VII - FHR 200 mg/kg т.м. + CP; VIII - FHR 400 mg/kg т.м. + CP; IX - FHA 400 mg/kg т.м.; X - FHR 400 mg/kg т.м.;
[в] %R – проценат редукције оштећења ДНК; $^{*}p < 0.05$ у поређењу са негативном контролном групом; $^{\dagger}p < 0.05$ у поређењу са позитивном контролном групом (CP).

Када се говори о највећој испитиваној дози екстраката *F. hexapetala*, пажњу треба усмерити и на групе V и VIII које су третиране FHA и FHR (400 mg/kg). У овом случају, не само да није дошло до редукције оштећења ДНК изазваних цисплатином, већ је укупни скор оштећења у овим групама (близу 230) био нешто виши у поређењу са позитивном контролом. Ови резултати би могли указивати на адитивни ефекат цисплатине и највише дозе екстраката *F. hexapetala*. При анализи дистрибуције класа комета, оштећене ћелије су биле највише концентрисане у класу 2 при свим третманима, али су евидентирана и максимална оштећења која припадају класи 4 у свим групама осим негативне контроле и групе X.

У односу на повећану миграцију ДНК у хепатоцитима у позитивној контроли третираној цисплатином, третман најнижом дозом екстраката FHA и FHR (100 mg/kg) био је у стању са смањи укупан скор оштећења за 36.1% у случају FHA и 30.1% у случају FHR. Такође, апликација FHA у вишим концентрацијама (200 и 400 mg/kg) довела је до редукције степена оштећења ДНК у поређењу са третманом са CP са %R 33.1 и 24.4%. Способан да делује антигентоксично био је и FHR екстракт у дози од 200 mg/kg са редукцијом оштећења ДНК од 23%. Као и у свим претходним случајевима, доза од 400 mg/kg за оба екстракта *F. hexapetala*, а посебно за екстракт корена, у комбинацији са цисплатином није имала велики утицај на смањење миграције ДНК у ћелијама јетре. Иако су се фреквенције оштећења ДНК у јетри пацова третираних само са 400 mg/kg FHA односно FHR екстраката (групе IX и X) значајно разликовале у односу на негативну контролу, генотоксичан ефекат оба екстракта био је значајно нижи него саме цисплатине у позитивној контроли.

Третман експерименталих животиња екстрактима надземног дела и корена биљке *F. hexapetala* генерално није имао значајан утицај на смањење генотоксичности у ћелијама бубрега изазване цисплатином. С друге стране, у ћелијама јетре примећен је антигенотоксични ефекат наведених екстраката, нарочито у концентрацији од 100 mg/kg. Ипак, иако су екстракти испољили известан заштитни ефекат, статистички укупни скорови у Комет тесту ни у једном случају нису редуковани на ниво негативне контроле и добијене вредности процента редукције оштећења биле су мање од 50%, у односу на резултате у позитивној контроли.

Резултати гено- и антигенотоксичних ефеката метанолних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* у три различите концентрације, испитивани *in vivo* у ћелијама бубрега и јетре експерименталних животиња, које су поред екстраката третиране и једном дозом цисплатине, указују на одсуство дозно зависне корелације активности (*Табеле 5.17. и 5.18.*). Разлог за ову констатацију лежи у чињеници да је најнижа концентрација екстраката и најефикаснија и да градацијско повећање концентрације није резултовало пропорционалним повећањем антигенотоксичног потенцијала примењених екстраката, тј. смањења цисплатином индуковане генотоксичности.

Дискусија

6

О биљним врстама из рода *Filipendula* Mill. (Rosaceae) није постојао велики број података, што у научној литератури, што у писаним изворима, иако се оне од давнина користе у традиционалној медицини бројних народа. Једини изузетак чини биљка *Filipendula ulmaria*, у нашем народу позната као медуника, која је једини представник овог рода уврштен у Фармакопеју, за коришћење у третманима запаљенских стања. На просторима еврпског континента, свакако и наше земље, заступљене су само две врсте из овог рода, поменута медуника и суручица (*Filipendula hexapetala*). Резултата упоредне хемијске и фармаколошке анализе ове две биљне врсте има јако мало и углавном се односе на цвет или надземни део, не и на корен, који се такође користио као саставни део разних лековитих препарата. Како се обе биљке у традиционалној медицини користе у исте сврхе, циљ експерименталног рада у оквиру ове докторске дисертације је био окарактерисати хемијски састав метанолних екстраката надземног дела и корена ових биљака, као и одредити фармаколошки потенцијал истих, базирано на принципима традиционалне медицине.

Укупан садржај и карактеризација фитојединења у биљном материјалу, од којих посебно место заузимају различите групе фенолних једињења, дају информацију о идентификацији биљне врсте и саставу коришћеног биљног материјала, али је то и један од најзначајнијих показатеља биолошке активности дате биљне врсте или одређених биљних делова. Како би се фитохемијска карактеризација извела у што прецизнијој мери, примењене су, како спектрофотометријске методе за дефинисање садржаја појединих група фенолних једињења, тако и више видова хроматографске анализе за идентификацију и квантификацију фитојединења у метанолним екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala*.

Код свих екстраката ове две биљне врсте из рода *Filipendula*, испитиваних у оквиру ове докторске дисертације, забележена је количина фенолних једињења која превазилази оквире од 200 mg GKE/g. Екстракт корена *F. ulmaria* је био најбогатији фенолним једињењима, а потом следе и екстракти надземних делова обе биљке. Екстракти надземних делова обе биљке су садржали значајну количину флавоноида, а у FHA екстракту је измерена скоро дупло већа количина флавоноида у односу на FUA. Сличан тренд је забележен и у случају одређивања укупне количине флавонола, док је фенолних киселина знатно више било у екстрактима корена. Истоветна ситуација је била и са количином танина, и кондензованих и галотанина, чије је присуство доминирало у екстрактима корена обеју биљака, са нешто већом количином у FUR екстракту. Иако је познато да испитиване биљне врсте нису богате антоцијанима, они су одређивани у свим екстрактима ради потврде присуства ове групе фенолних једињења. Количина антоцијана је заиста била незнатна, једини изузетак је био FHA екстракт са нешто вишом количином мономерних и укупних антоцијана у односу на друге екстракте. Прегледом литературних података установљено је да су Harbourne *et al.* (2009)[40] испитивали садржај укупних фенола у сувом екстракту хербе *F. ulmaria*, а те вредности су варирале од 110 до 119 mg GKE/g, у зависности од услова сушења. Исто истраживање потврдило је висок садржај флавоноида и хидролизабилних танина у надземном

делу ове биљке (чак 30-35 % од сваке групе). Знатно мању количину укупних фенола у метанолном екстракту биљке *F. ulmaria* од 26.8 mg GKE/g детектовали су Kähkönen *et al.* (1999)[90]. С друге стране, Barros *et al.* (2011)[14] детектовали су много већу количину укупних фенолних једињења у екстракту биљке *F. ulmaria* (228 mg GKE/g), али се мора нагласити да је у питању екстракт цветова. Међутим, Proestos *et al.* (2013)[89] су утврдили да је садржај фенола у екстракту цвета *F. ulmaria* био прилично низак, 77.4 mg GKE/g. Gião *et al.* (2007)[88] испитивали су садржај фенолних једињења у инфузима самлевеног и целог листа, као и декокту листова (прокуваном) биљке *F. ulmaria* и добили вредности које се крећу од 64 mg GKE/L за инфуз целог листа, потом 87 mg GKE/L за декокт и на крају 117 mg GKE/L измерено је у инфузу самлевеног листа. Такође, Katalinić *et al.* (2006)[84] испитивали су количину фенолних једињења у инфузу хербе медунике и добијена вредност изражена у еквивалентима катехина (CE) износила је 1136 mg CE/L. Piwowarski *et al.* (2011)[41] измерили су да садржај укупних полифенола у херби медунике (*F. ulmaria*) износи око 30.6%, док је укупан садржај танина био 21%, тако да су ови резултати нешто приближнији онима добијеним у експерименталном делу ове докторске дисертације. Најскорије истраживање које су публиковали Olennikov *et al.* (2017)[85] указује да су декокти биљака из рода *Filipendula* изузетно богати фенолним једињењима, где је запремина од 100 mL декокта надземног дела *F. ulmaria* садржала око 55.31 mg флавоноида, дупло већу количину танина (100.88 mg), малу количину катехина (5.69 mg) и проантоцијанидина (3.83 mg), што у великој мери корелира са нашим резултатима.

Када говоримо о спектрофотометријској анализи количине фенолних једињења у биљци *F. hexapetala*, немогуће је а не приметити да је број литературних података знатно сиромашнији у односу на многобројне анализе биљке *F. ulmaria*. Oszmianski (2007)[123] је са сарадницима испитивао садржај неких група фенолних једињења у екстракту корена *F. hexapetala* и установио да количина укупних проантоцијанидина у једном килограму корена износи 15.7 mg, док је у истој количини корена детектовано врло мало фенолних киселина (0.03 mg/kg). Укупну количину флавоноида у надземном делу биљке *F. hexapetala* приказали су Imbrea *et al.* (2010)[113] на више екстраката *F. hexapetala* са различитих територија, при чему је количина флавоноида варирала између 368 и 660 mg/g сувог екстракта, изражено у еквивалентима кверцетина. Штавише, и Pukalskienė *et al.* (2015)[119] су установили да различити екстракти и фракције надземног дела *F. hexapetala* садрже значајну количину укупних фенолних једињења, где у фенолном садржају предњаче ацетонски и метанолни екстракти, као и етилацетатна фракција (са преко 350 mg GKE/g), а најмања количина фенолних једињења измерена је у воденој фракцији (12 mg GKE/g). Свакако да су још раније многе истраживачке групе утврдиле изражено присуство флавоноида (посебно у надземном делу), танина (више у корену) и других група фенолних једињења у екстрактима обе испитиване биљне врсте, као што су уосталом потврдила и наша испитивања. Али, како су за те анализе коришћене хроматографске методе, нешто више речи о тим резултатима биће у следећем сегменту.

Како би се утврдило присуство појединих једињења из групе природних фенолних једињења у метанолним екстрактима испитиваних биљних врста коришћени су принципи стандардизације екстраката хроматографским методама. Стандардизација представља методу која осигурава минимални ниво активних састојака у биљном екстракту и којом се одређују референтне компоненте за одређене биљне врсте. Ова метода је изузетно значајна јер обезбеђује одржавање нивоа високо квалитетних фитофармацеутских производа и може се дефинисати као успостављање репродуцибилног квалитета упоређивањем производа тј. екстракта са утврђеним референтним супстанцама и дефинисањем минималне количине једног или више једињења или група једињења које производ може садржати. Стандардна једињења која се користе у ове сврхе су најчешће побројана у оквиру фармакопеја и/или неких монографија.[10] Тако је у Wagner-овом „Атласу танкослојне хроматографије“[136] назначен принцип идентификације и стандардизације биљке *Filipendula ulmaria,* уз наведене стандардне компоненте (спиреозид и рутин) и систем растварача који се користи, а исти је коришћен у методама танкослојне хроматографије (TLC) и танкослојне хроматографије високих перформанси (HPTLC) примењеним у оквиру ове докторске дисертације. На исти начин одређивани су и екстракти друге биљне врсте, за коју је раније установљено да садржи спиреозид.[49] Обема методама потврђено је присуство овог деривата кверцетина у екстрактима надземних делова обе биљке, а поред тога и присуство рутина у FUA екстракту и хиперозида у FHA екстракту. HPTLC метода је показала да екстракти надземних делова поседују још једну заједничку компоненту, то је изокверцитрин, још један дериват кверцетина, а само је FHA екстракт садржао кверцетин у агликонском облику.

Као најпогоднији вид квантификације фенолних једињења присутних у екстрактима испитиваних биљних врста изабрана је течна хроматографија високих перформанси (HPLC). Овом анализом је установљено да је спиреозид заиста присутан у екстрактима надземних делова обе биљке, при чему је његов садржај знатно већи у FHA екстракту (21.80 mg/g сувог екстракта). Управо ово једињење идентификовано је и у другим научним истраживањима побројаним у *Табели 2.2.* и то пре свега у цвету, листу и у читавом надземном делу обе испитиване биљке, али и у листу и цвету других биљних врста које припадају роду *Filipendula* Mill.[49] Неки литературни подаци чак указују да је спиреозид идентификован и у корену биљке *F. hexapetala*.[112,122] Присуство скоро свих коришћених референтних фенолних једињења ограничено је на екстракте надземих делова обеју биљних врста, док су екстракти корена садржали искључиво катехин и епикатехин. Што се тиче осталих деривата кверцетина који су идентификовани методама TLC хроматографије, HPLC анализом је потврђено да је хиперозид заиста конституент само FHA екстракта, и то у значајној количини (12.16 mg/g), док је мања количина рутина квантификована само у FUA екстракту, што се на снимљеним TLC-хроматограмима јасно дало уочити. Количина кверцетина у FHA екстракту, за који се HPTLC анализом закључило да улази у састав само овог екстракта, била је нижа у односу на сва остала идентификована једињења (4.49 mg/g), али након хидролизе екстраката количина кверцетина у FHA је нагло порасла, чак десет пута више, али је квантификована и значајна количина кверцетина у FUA екстракту. Још једна

заједничка карактеристика FUA и FHA екстраката је присуство галне киселине, чија се количина након хидролизе додатно увећала захваљујући хидролизовању неких њених деривата у екстрактима, и епикатехина, који је био идентификован као количински најприсутнији конституент у оба екстракта. Интересантно је запазити да је елагинска киселина детектована само у FHA екстракту, али је након хидролизе била присутна у свим екстрактима, што указује на присуство њених деривата, највероватније елагитанина, у свим деловима испитиваних биљака. Уосталом, идентична констатација се може извести и у случају претходно поменуте фенолне киселине – галне киселине, тако да се на основу ових података може указати на присуство обе групе хидролизабилних танина, и елагитанина и галотанина, у чијој су структури хидроксилне групе угљених хидрата делимично или потпуно естерификоване фенолним групама елагинске или галне киселине. Иако ни кафеинске киселине није било у нехидролизованим екстрактима, извесна количина је квантификована након хидролизе FHA екстраката, што може значити и присуство неких деривата ове киселине. Такође, мала количина ванилинске киселине детектована је у хидролизату FHR екстракта, што би, посматрано на исти начин, значило да постоји неки њен дериват у корену *F. hexapetala*. Међутим, до сада не постоји ни један литературни податак који би могао да поткрепи ову тврдњу. Многе истраживачке групе су претходно наведене фенолне киселине детектовале у испитиваним биљкама или врстама из истог рода, па је тако потврђено присуство хидролизабилних танина[67,81], галоилхинске киселине[49], хлорогенске киселине и других деривата кафеинске киселине[49,58]. Није само количина кверцетина увећана након хидролизе FUA и FHA екстраката, већ је у хидролизатима детектован и други флавоноид кемпферол, иако не у тако великој количини, али присутнији у FHA. Ови резултати наговештавају да испитиване биљке у својом надземним деловима садрже гликозиде који представљају деривате ових флавоноида. Поређењем количине кверцетина у хидролизованим екстрактима и количине истог у спиреозиду, рутину и хиперозиду из испитиваног материјала, види се да је она много већа од збирне количине ових деривата, што води до закључка да се, сем ових једињења, и неки други деривати кверцетина налазе у FUA и FHA екстрактима, а да нису детектовани примењеном HPLC анализом. И литературни подаци умногоме потврђују ову констатацију. Тако су истраживачке групе Barros *et al.*[63] и Olennikov и Kruglova[49] године 2013. квантификовале велике количине различитих деривата кверцетина у цвету медунике, док су Dadáková *et al.* (2010)[83] уочили значајну количину укупног кверцетина у надземном делу исте биљке. Што се тиче деривата кемпферола, Papp *et al.* (2004)[3] су потврдили да екстракт листа *F. ulmaria* садржи неколико гликозида овог флавоноида. Поред тога, у екстрактима цвета обе биљне врсте детектовани су деривати кемпферола, од којих је најчешће присутан астрагалин (кемпферол 3-*O*-гликозид).[81,108,119] Квантитативна детерминација индивидуалних флавоноидних гликозида у биљним материјалима је прилично тешка, посебно због њиховог великог броја. Олакшање квантификације флавоноида доноси управо хидролизирање узорка, па се на тај начин добијени агликони много лакше могу идентификовати и квантификовати. Међутим, мора се узети у обзир да услови хидролизе, који резултују раскидањем гликозидне везе, могу бити превише интензивни за друге групе фенолних једињења присутне у истом биљном материјалу.

Тако је, на пример, концентрација катехина и епикатехина била значајно нижа у хидролизованим екстрактима, што указује на деградацију ових једињења у условима повишене температуре и киселој средини. О деградацији катехина услед киселе хидролизе су известили и Häkkinen *et al.* (1998).[332]

Иако је хемијска карактеризација испитиваних екстраката успешно дефинисана помоћу HPLC анализе и подаци који су добијени у складу су са неким већ доступним литературним изворима, велики број једињења је остао неидентификован, нарочито у екстрактима корена обе биљке. Укупна количина фенолних једињења говори нам да је у корену присутан широк дијапазон полифенола, а не само катехин и епикатехин. Такође, у надземним деловима *F. ulmaria* и *F. hexapetala* нису окарактерисани сви фенолни деривати, поготово флавоноидни гликозиди, услед недостатка одговарајућих референтних компонената. То је један од разлога употребе LC-MS хроматографске анализе, којом се, захваљујући особинама које поседује, комплетан фенолни садржај у екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala* могао подробно испитати. Како су већ били доступни извесни подаци добијени управо LC-MS хроматографијом екстраката две испитиване биљне врсте, то је и комплетна квалитативна анализа била знатно олакшана поређењем хроматографских и масених спектара са публикованим резултатима LC-MS фитохемијских анализа и „online" база података, уколико није било референтног стандарда. Резултати LC-MS анализе испитиваних екстраката потврдили су присуство широког спектра фенолних једињења, као што су фенолне киселине, флавоноиди и танини, за које је доказано да имају различите биолошке активности. Једна од најзначајнијих група полифенола јесу флавоноиди и њихови деривати. Њихов значај се огледа, поред важности за сам раст и развој биљке, и у испољавању изузетне фармаколошке активности, а тиме и деловању на здравље човека и животиња.[141] Ова група једињења је детектована у свим испитиваним екстрактима, али је свакако доминантна у екстрактима надземних делова, FUA и FHA, и то пре свега гликозиди кверцетина. Агликон кверцетина детектован је само у FHA екстракту, као и приликом HPLC анализе, док су FUA екстракту били доминантни кверцетин хексурониди, од којих је један највероватније миквелианин идентификован у екстракту надземног дела *F. ulmaria* од стране Bijttebier *et al.* (2016).[58] Поново је потврђено присуство спиреозида у надземним деловима обе биљке, што је у складу са нашим ранијим анализама и литературним подацима.[49,58,81,85,333] Два изомерна деривата, кверцитрин и изокверцитрин, идентификовани су у FUA и FHA екстрактима, док је кверцитрина било у FUR, а изокверцитрин је био присутан у FHR у траговима. Услед осетљивости примењене аналитичке методе, поред идентификације хиперозида у FHA екстракту (што је потврђено осталим хроматографским методама), мале количине овог једињења детектоване су LC-MS анализом и у FUA екстракту. До сличних резултата се дошло у скоријим истраживањима група Bijttebier *et al.* (2016)[58] и Pukalskienė *et al.* (2015)[119], а Samardžić *et al.* (2017)[333] су потврдили да се HPLC анализом хиперозид не може детектовати у надземном делу биљке *F. ulmaria*, док је у надземном делу *F. hexapetala* хиперозид идентификован и квантификован (обе биљке из ове студије су такође са подручја Србије). Закључак који је изведен на основу резултата HPLC анализе хидролизованих екстракта за количину кверцетина управо је потврђен применом масене спектрометрије. Присуство осталих

деривата кверцетина је детектовано LC-MS анализом, па је мала количина рутина забележена у FUA екстракту, а многи галоиловани или метиловани хексозиди кверцетина присутни су у FHA екстракту. На основу резултата HPLC анализе закључено је да су у екстрактима надземних делова присутни и неки деривати флавоноида кемпферола. LC-MS анализом је ова тврдња оправдана, јер је у FUA екстракту детектовано присуство кемпферол-хексозида у малој количини, а највероватније је у питању астрагалин.[49,58,81,119] У FHA екстракту, поред претходно наведеног деривата, присутан је и галоилован облик истог, али и флавоноид аромадендрин (дихидрокемпферол), чије су присуство у другој биљци (*F. ulmaria*) потврдили Bijttebier *et al*. (2016).[58] Флавоноиди у облику гликозида (где су шећерни делови пентозе, хексозе или хексуронске киселине) или галоиловани гликозиди, супротно неким другим истраживањима[58], нису били идентификовани у испитиваним екстрактима биљке *F. ulmaria*. Једињења која такође припадају групи флавоноида, прецизније флаван-3-олима, а идентификована су у испитиваним екстрактима применом обе методе течне хроматографије, су катехин и епикатехин. Резултати HPLC анализе потврђени су и LC-MS хроматографијом, тако да је присуство катехина забележено у свим екстрактима осим FHA, али је епикатехин детектован само у FUA, док је у екстрактима *F. hexapetala* епикатехин био присутан искључиво у облику својих деривата. Иако је HPLC анализа потврдила присуство епикатехина и у FHA екстракту, могуће је да тај пик потиче од деривата епикатехина, који се јавља на истом ретенционом времену као и стандард епикатехина и показује готово исти UV-VIS апсорпциони спектар. Заправо, на основу добијених резултата HPLC и LC-MS анализе екстраката, примењена HPLC метода не може бити потпуно поуздана за идентификацију и квантификацију епикатехина у испитиваним биљкама. С друге стране, катехини и процијанидини (кондензовани танини) детектовани су LC-MS анализом у свим екстрактима обе биљне врсте, а за њих се зна да поседују низ корисних здравствених ефеката на организам.[334–337] Присуство олигомерних процијанидина, базираних на молекулима (епи)катехина (све до октамера), већ је забележено у надземним деловима *F. ulmaria*.[58,63] Такође, у надземним деловима *F. ulmaria* већ је детектовано и постојање хидролизабилних танина, које смо ми потврдили спектрофотометријским и хроматографским анализама.[58,63,81] Међутим, супротно од Bittjebier-a и сарадника (2016)[58], ми нисмо били у могућности да идентификујемо галоил хексозиде у екстрактима *F. ulmaria*, али су исти били присутни у надземном делу биљке *F. hexapetala*.

Када говоримо о фенолним киселинама, свакако је од примарног интереса детекција салицилне киселине, карактеристичне за овај род биљака. Посебно познат извор салицилне киселине и салицилата је управо *F. ulmaria*.[338] Међутим, осим гаултерина, као јединог деривата салицилне киселине у екстрактима биљке *F. ulmaria*, нисмо успели идентификовати ни један од многобројних деривата салицилне киселине или салицина описаних од стране других истраживачких група.[58,338] Гаултерином је богат и надземни део биљке *F. hexapetala*, а исти је идентификован и у екстракту корена (FHR), и то у два изомера. Поред тога, у FHA екстракту детектован је и мали пик салицилне киселине. Супротно нашим резултатима, Samardžić *et al.* (2017)[333] су квантификовали много већу количину салицилне киселине у *F. ulmaria* у односу на *F. hexa-*

petala, али треба имати у виду да се у поменутој студији ради о анализи лиофилизираног инфуза цвета ове две биљне врсте. Изненађујуће је изостајање присуства метил салицилата, доминантног салицилата у цвету биљака из рода *Filipendula*. Могућ сценарио неуспеле идентификације овог једињења јесте његова лака испарљивост и губитак једињења у току процеса сушења биљног материјала. Иста ситуација је и са салицил алдехидом. Сви доступни подаци везани за детекцију метил салицилата, као и салицил алдехида, у биљкама из рода *Filipendula* тичу се заправо етарског уља.[116,121] Једини начин добијања метил салицилата у овом случају јесте хидролиза гаултерина. Гална киселина, као једна од основних фенолних киселина, присутна је у надземним деловима обе биљке што је и показано HPLC анализом. Међутим, услед недовољног проучавања хемијског састава и метаболизма фенолних једињења у *F. hexapetala*, интересантно је да, поред присуства различитих деривата галне и елагинске киселине, у FHA екстракту има и деривата кафеинске киселине, који су до сада детектовани само у *F. ulmaria*.[58,63]

Многобројност класа фенолних компоненти, као и количина појединачних фитојединења, у екстрактима испитиваних биљака из рода *Filipendula* указују и на широк дијапазон потенцијалних биолошких и фармаколошких активности које ови екстракти могу испољити. Како је опште позната мултифункционалност полифенола у *in vitro* и *in vivo* условима[130,141,151], дизајн и бројност експерименталних метода у оквиру ове докторске дисертације, као и мултидисциплинарни приступ задатој проблематици, требало је да пружи што јаснији увид у што већи број видова фармаколошке активности, али и начин и механизам деловања екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*. Свакако, испитиване биолошке активности су базиране на традиционалној употреби ових биљака у сврху лечења.

Једна од најважнијих биолошких активности биљака и биљних производа, која лежи у основи њиховог деловања на бројна патофизиолошка стања и заштите организма, јесте антиоксидативна активност. Способност да поседују антиоксидативна својства биљке дугују комплексној смеши различитих антиоксиданата који улазе у њихов хемијски састав, углавном полифенолних једињења са различитим механизмима деловања. Због синергистичких интеракција које полифеноли испољавају, неопходно је користити неколико метода како би се на што релевантнији начин, у *in vitro* условима, утврдио антиоксидативни капацитет биљних екстраката.[339] Стога је у овој докторској дисертацији антиоксидативни потенцијал метанолних екстраката надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* одређиван помоћу десет *in vitro* тестова, који су базирани на различитим механизмима антиоксидативног деловања, од директног „хватања“ и неутрализације слободних радикала, редукције и хелатације слободних радикала, па до инхибирања ланчаних реакција код липидне пероксидације у различитим модел системима. Утврђено је да сви тестирани екстракти показују висок степен антиоксидативне активности, у поређењу са чистим фенолним једињењима и БХТ-ом, као референтним стандардима. IC_{50} вредности екстраката крећу се од 10.58 μg/mL (FUR) за неутрализацију DPPH радикала, па све до 1057.58 μg/mL (FHA) за неутрализацију супероксид радикал анјона. Такође, забележена је прилично добра редуктивна активност екстраката (свих осим FHR) у опсегу концентрација од 0.05 до 0.2 mg/mL,

која је у рангу са активношћу кверцетина у истим концентрацијама. Једини изузетак представља изостанак хелатационог капацитета екстраката, али и већине стандардних једињења (IC_{50} > 4000 μg/mL), осим ЕДТА. На основу добијених резултата, не може се јасно дефинисати који од испитиваних екстраката има најизраженија антиоксидативна својства, а исто важи и за конкретан биљни орган, иако су екстракти корена показали висок степен укупне антиоксидативне активности. Многи добијени резултати антиоксидативног капацитета упоредиви су са већином коришћених стандарда. Најниже IC_{50} вредности свих испитиваних екстраката забележене су код одређивања способности неутрализације $DPPH^{\cdot}$ и $ABTS^{\cdot+}$ (између 10.58 и 36.75 μg/mL), што у односу на стандардна фенолна једињења представља изузетно добре резултате. Иако су IC_{50} вредности за $O_2^{\cdot-}$ и $NO^{\cdot}$ биле значајно више, сам однос активности референтних фенолних једињења говори у прилог чињеници да су испитивани екстракти заиста испољили значајне антиоксидативне ефекте. Што се тиче антиоксидативног деловања према споменутим реактивним врстама кисеоника и азота, многи литературни подаци су у складу са нашим резултатима. Тако да, што се тиче екстраката надземног дела *F. ulmaria*, у скорашњим испитивањима Pukalskienė *et al.* (2015)[87] и Neagu *et al.* (2015)[70], потврђена је висока антиоксидативна активност према $DPPH^{\cdot}$ и $ABTS^{\cdot+}$, у првом случају метанолног, у другом етанолног екстракта, у односу на водени екстракт ове биљке. Прва група аутора је анализирала и *on-line* HPLC-UV-$DPPH^{\cdot}$ „скевинџер" активност, како би детектовала које компоненте у екстракту *F. ulmaria* имају најизраженију антиоксидативну активност, и дошли су до закључка да су у питању два једињења типа тригалоил HHDP-хексозе, који су такође идентификовани и у нашим испитивањима. Такође, испитивањима на нивоу модел реакције електроредукције кисеоника, утврђено је да етанолни екстракт надземног дела *F. ulmaria* поседује изражен антиоксидативни ефекат, са кинетичким параметрима у рангу аскорбинске киселине.[61] Katalinic *et al.* (2006)[84] су при анализи више од 70 екстраката лековитих биљака установили да екстракт надземног дела *F. ulmaria* (*Spiraea herba*) поседује изузетну редуктивну (FRAP) активност, од које је био ефикаснији само екстракт листа матичњака (*Melissae folium*). Поред тога, у групи од 16 биљних екстраката чију су антиоксидативну активност на нивоу $DPPH^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$ и $OH^{\cdot}$ радикала анализирали Trouillas *et al.* (2003)[60], екстракт *F. ulmaria* се издвојио са својим резултатима као далеко најјачи антиоксидант. Изузетна антиоксидативна активност екстракта цвета[51,89] и инфуза листа[88] *F. ulmaria* такође је потврђена применом различитих спектрофотометријских метода од стране неколико аутора. Екстракт корена *F. ulmaria* до сада није испитиван, али постоје подаци да је екстракт корена биљке *F. hexapetala* имао значајну способност „хватања" $DPPH^{\cdot}$ и $ABTS^{\cdot+}$ у поређењу са екстрактима корена неких других врста из породице Rosaceae.[123] У студији која је изведена са екстрактом цвета *F. hexapetala*, Maksimović *et al.* (2007)[118] су показали на нивоу DPPH радикала да је коришћени екстракт изузетно моћан антиоксидант, само неколико пута слабији од кверцетина, док су IC_{50} вредности екстракта и кверцетина у FRAP методи биле скоро идентичне. При анализи *on-line* HPLC-UV-$DPPH^{\cdot}$ „скевинџер" активности екстракта *F. hexapetala*, аналогно претходном испитивању екстракта *F. ulmaria*, Pukalskienė *et al.* (2015)[119]

показали су да најизраженији антиоксидативни потенцијал испољава тригалоил HHDP-хексоза и њен димер.

Поред добро познате протективне улоге антиоксиданата код спречавања развитка разних болести, они имају и велики значај у превенцији кварења хране богате мастима услед процеса оксидације. Оксидација липида у прехрамбеним производима утиче на њихову боју, мирис, укус, текстуру, нутритивну вредност и код људи може проузроковати разна штетна стања услед конзумације потенцијално токсичних продуката поменутих реакција.[279] Овај процес оксидације представља велики проблем управо услед секундарних продуката који у току њега настају, а који реакцијом са многим биомолекулима могу испољити цитотоксичне, као и генотоксичне ефекте. Један од производа који настају у највећој мери у току липидне оксидације јесте малондиалдехид (MDA), који је један од најчешће коришћених маркера (TBARS) за одређивање нивоа липидне (пер)оксидације у неком систему помоћу тиобарбитурне киселине (TBA).[174,330] Липидна пероксидација састоји се од низа ланчаних реакција које су у природи аутокаталитичке, али могу бити заустављене деловањем антиоксиданата синтетичког и природног порекла. У лабораторијским условима могу се користити различите методе за одређивање способности антиоксидантних једињења или смеша (типа биљних екстраката) да инхибирају оксидацију липида.[328,329] Полинезасићене масне киселине, као што је линолна киселина, лако се оксидују у присуству кисеоника из ваздуха. Ова аутооксидација води до стварања пероксида линолне киселине. Поред остварене *in vitro* антиоксидативне активности екстраката на нивоу различитих слободних радикала, у примењеним модел системима способност испитиваних екстраката за инхибицију липидне пероксидације је дошла до изражаја. У модел систему уље/вода, при спречавању формирања хидропероксида, најбоље су се показали екстракти биљке *F. hexapetala,* са резултатима упоредивим са кверцетином, док су у модел систему са β-каротеном и линолном киселином у спречавању оксидације липида предњачили екстракти надземних делова обе биљке (FUA и FHA). Оксидација липида је један од главних узрочника настајања различитих обољења у организму, али и драстичног смањења квалитета прехрамбених производа што такође може имати утицаја на здравље конзумената истих. Поред развијања микроорганизама у намирницама, оксидација липида је један од најнепожељнијих процеса у прехрамбеној индустрији. То је разлог за употребу разних адитива, нарочитно оних синтетичког порекла, који би успорили или потпуно зауставили развој ових процеса кроз инхибицију слободно-радикалских реакција.[278] Најчешће коришћени синтетички антиоксиданти, као што су бутиловани хидроксианизол (БХА) и бутиловани хидрокситолуен (БХТ), показали су и неке штетне ефекте међу којима су најозбиљнији изазивање оштећења ДНК ланаца и карциногенеза.[340] У модел систему уље/вода, БХТ, као неполарно једињење, испољио је највиши степен инхибиције липидне пероксидације. Исти случај је примећен у и месо модел систему, где је БХТ, у концентрацији знатно нижој од примењених екстраката (50 mg/kg), имао изузетан ефекат на липидну пероксидацију у месу. Резултати потврђују добро познату чињеницу да поларни антиоксиданти остају у воденој фази емулзије или система и тако бивају мање активни у заштити масних киселина од оксидације. С друге стране, липофилни антиоксиданти, услед веће заступљености у липи-

дној фази, испољавају и већу активност, посебно у емулзијама.[341] Међутим, и испитивани метанолни екстракти биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* су показали значајне антиоксидативне концентрационо зависне ефекте, у примењеним концентрацијама (100 и 500 mg/kg) у поређењу са контролом, спречавајући развијање липидне пероксидације и формирања TBARS у свежем месу, све до седмог дана чувања. Након тог периода, мерење параметара липидне пероксидације није могло бити валидно услед нестабилности продуката у овом процесу, посебно MDA и кратколанчаних једињења, као и настајања компонената, као што су алкохоли и киселине, које не могу ступити у реакцију са TBA.[279,330] На основу резултата у оквиру овог модел система може се закључити да су највећи степен антиоксидативне заштите испољили екстракт корена *F. ulmaria* и екстракт надземног дела *F. hexapetala*. Добијени резултати у складу су са истраживањима Kim *et al.* (2013)[342], Falowo *et al.* (2014)[278] и Jiang и Xiong (2016)[343], који су потврдили да додатак екстраката богатих полифенолима штити производе од меса од липидне оксидације, тако да се биљни екстракти могу користити као мултифункционални „конзерванси“ у месним производима и прерађевинама. Поред тога, нека истраживања потврдила су способност екстраката, најчешће цвета, *F. ulmaria* и *F. hexapetala* ка инхибицији липидне оксидације, применом различитих *in vitro* метода.[51,90,118]

Резултати добијени при испитивању антиоксидативне активности екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* на различитим нивоима потврђују њихову ефикасност у деловању против реактивних врста кисеоника и азота, у *in vitro* условима. Обим деловања ових екстраката указује да су за њихову антиоксидативну активност одговорни вишеструки механизми, који се ослањају управо на њихов хемијски састав и садржај читавог дијапазона фенолних једињења која испољавају исте биолошке особине. Како се примењене методе заснивају или на механизму трансфера атома водоника (HAT) или на преносу једног електрона (SET), оне бивају намењене за мерење капацитета „хватања“ радикала (или оксидативног капацитета), уместо за одређивање превентивног антиоксидативног капацитета узорка.[344] Ограничења *in vitro* испитивања антиоксидативног потенцијала узорака у клиничким условима морају се узети у обзир, јер хемијске реакције у *in vitro* методама нису идентичне онима у биолошким системима. Валидност добијених резултата је ограничена стриктно на хемијски смисао, али би могла бити оправдана употребом тестова којима би се добиле информације о биорасположивости екстраката, *in vivo* стабилности, могућности задржавања антиоксиданата од стране ткива и реактивности *in situ*.[344,345]

Информације о стабилности једињења и биљних екстраката, који се инкорпорирају у неки систем ради његове заштите, од изузетног су значаја јер дефинишу могућност и оправданост њихове примене у различитим фармацеутским, козметичким и прехрамбеним формулацијама. Обрада биљног материјала (лековитих биљака, зачина, воћа или поврћа) на различите начине доводи до промена у хемијском саставу материјала, садржају биоактивних једињења и биолошкој активности истих.[331] Један од циљева ове докторске дисертације био је утврдити степен стабилности метанолних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* подвргнутих различитим pH вредностима средине и различитим временским интервалима загревања на 100°C. Поред тога, узор-

ци су подвргнути процесу симулиране дигестије у *in vitro* условима како би се одредило на који начин се понашају екстракти након уношења у организам. Стабилност је посматрана кроз призму количине укупних фенолних једињења у узорку и антиоксидативне активности на нивоу DPPH радикала. Посматрањем разних видова стабилности долази се до резултата, на основу којих се може предвидети активност екстраката у различитим условима. Добијени резултати сугеришу да би испитивани екстракти могли имати примену у рангу pH од 1–9, без значајнијег смањења антиоксидативне активности. Кисели услови средине доводе до хидролизе и/или трансформације у структури фенолних једињења у екстрактима. Такође, литературни извори указују да су фенолне киселине јако мало стабилне у односу на промену pH средине, док на флавоноиде најчешће не утичу базни или кисели услови.[346] Штавише, флавоноиди, а посебно флаван-3-оли, су изузетно термостабилни, јер у воденим растворим могу градити интермолекулске водоничне везе.[331] Пошто су екстракти надземних делова *F. ulmaria* и *F. hexapetala* били генерално нешто богатији флавоноидима и њиховим дериватима, у односу на екстракте корена, то не изненађује њихова нешто виша релативна антиоксидативна активност на различитим pH средине, као и у току двосатног загревања. Такође, промене у количини укупних фенолних једињења у узорцима прате сличан тренд. Нека испитивања биљке *F. ulmaria*, управо на тему стабилности, публиковала је Harbourne-ова истраживачка група (2009. и 2013. године). Они су установили да се при екстракцији хербе *F. ulmaria* на температури 90°C и преко 90°C, у трајању од 15 min, добија екстракт који поседује најбоље особине за инкорпорацију у прехрамбене производе.[67] Резултате везане за pH стабилност *F. ulmaria* су објавили неколико година касније, са закључком да је херба *F. ulmaria* најстабилнија на опсегу pH од 5 до 7.[347]

У циљу добијања ближих информација о томе какав би се интензитет биолошке активности могао очекивати након уноса испитиваних екстраката у организам, резултати њихове стабилности у току и након *in vitro* симулираног процеса варења говоре у корист примене ових екстраката испитиваних биљака из рода *Filipendula*. Док је садржај укупних фенолних једињења у екстрактима у желудачној и дуоденалној фази дигестије варирао, релативна антиоксидативна активност је остала приближно једнака у желудачној фази. Касније, у дуоденалним условима, примећено је извесно опадање антиоксидативног потенцијала, посебно код екстраката надземних делова обе биљне врсте (FUA и FHA). У желуцу, услед киселе хидролизе, могу се ослободити фенолна једињења мале молекулске масе, која су до тада била везана у облику танина или неких других полимера. Ова једињења на тај начин могу постати доступна за процес апсорпције у дуоденуму и танком цреву (јејунуму), који су управо главна места апсорпције и трансформације фенолних једињења.[132] Испитивани екстракти су *in vitro* симулацијом транспортовани из желудачне у дуоденалну фазу, па је дошло до значајне промене pH вредности средине због неутрализације киселих желудачних услова компонентама жучног и панкреасног сока. Зависно од њихове хемијске структуре, фенолна једињења су прилично нестабилна у алкалним условима.[132] Chen *et al.* (2014)[348] су у свом истраживању потврдили да су екстракти одабраног воћа испољили знатно бољу антиоксидативну активност у DPPH методи након желудачне фазе, него што је то случај после дуоденалне фазе дигестије, највероватније услед киселих pH услова средине у првој фази

и настанка нових фенолних једињења услед процеса хидролизе. Мања активност након дуоденалне дигестије може се свакако приписати великој осетљивости полифенола на алкалне услове. Ови резултати су већином у корелацији са онима из наших испитивања. Такође, неке раније студије показале су да *in vitro* дигестија смањује количину галне и ферулне киселине, у соку ароније (*Aronia melanocarpa*), управо због мале стабилности ових једињења при промени pH средине. С друге стране, промене pH при желудачној *in vitro* дигестији нису утицале на садржај и стабилност флавонола, флаван-3-ола и кафеинске киселине.[349] Такође, Bermúdez-Soto *et al.* (2007)[349] показали су да након дуоденалне *in vitro* дигестије флавоноли, антоцијани и флаван-3-оли постају нестабилни. Овај потенцијални губитак фенолних једињења у дуоденалним условима може се делимично оправдати ниском биодоступношћу неких од њих. Резултати Tagliazucchi *et al.* (2010)[350], за релативну антиоксидативну активност чистих фенолних једињења, индивидуално подвргнутих *in vitro* процесу симулиране дигестије што је праћено ABTS тестом, указали су на незнатно смањење антиоксидативне активности након желудачне фазе, док је панкреасна дигестија проузроковала повећање релативне активности галне киселине и катехина. Ово је могућ разлог пораста антиоксидативног потенцијала екстраката надземних делова *F. ulmaria* и *F. hexapetala* на трећем сату експеримента. Генерално, наши резултати истичу изражен антиоксидативни капацитет свих испитиваних екстраката у *in vitro* условима, високу релативну антиоксидативну активност екстраката током читавог процеса *in vitro* дигестије, и тако уверавају да они могу имати и значајан биолошки ефекат у *in vivo* условима.

Антимикробна активност једињења биљног порекла, посебно фенолних једињења, је врло добро позната.[351] Све више расте интерес за изучавање природних производа, најчешће из биљних извора, који испољавају антимикробне ефекте и немају негативних последица на здравље човека. Резултати испитивања антимикробне актвности метанолних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* у оквиру ове докторске дисертације показали су да сви екстракти имају приближне вредности минималних инхибиторних концентрација, у односу на бактеријску или фунгалну врсту која је третирана. Испитивани екстракти најефикаснији су били у спречавању раста стандардних сојева бактерија *E. coli* и *M. lysodeikticus*, као и изолата *S. aureus* и *E. faecalis*, при чему се посебно истичу екстракти надземних делова (FUA и FUR). Ипак, добијене резултате тешко је упоредити са резултатима коришћених стандардних антибиотика еритромицина, амрацина и хлорамфеникола, јер као чисте супстанце они имају знатно ниже MIC вредности. Сличне резултате добили су Rauha *et al.* (2000)[95] при испитивању екстракта хербе *F. ulmaria*, па је екстракт показао значајан антибактеријски ефекат у односу на *E. coli* и *S. aureus*. Gniewosz *et al.* (2014)[108] потврдили су да екстракт цвета *F. ulmaria* испољава известан антибактеријски ефекат у третману плодова јабука са филмом у који је екстракт инкорпориран, са MIC вредностима између 0.2–6 mg/mL и посебно значајним резултатима за *S. aureus* и *B. subtilis*. У овом случају, екстракт је био знатно мање активан у третману *E. coli*. Екстракт *F. ulmaria* је у студији Proestos *et al.* (2013)[89], супротно нашим резултатима, имао јако слаб антимикробни ефекат на *S.*

aureus и био потпуно без активности на *E. coli*, што се показало и код Boziaris *et al*.[93] Једина студија која се бавила антимикробном активношћу биљке *F. hexapetala* и синергизмом деловања салицил алдехида, потврдила је изузетну активност етарског уља ове биљке на бактерије *E. coli, S. aureus* и *K. pneumoniae,* као и фунгалне сојеве *A. niger* и *C. albicans*.[116] На основу резултата за антифунгалну активност, може се закључити да екстракти надземних делова *F. ulmaria* и *F. hexapetala,* у поређењу са екстрактима корена обе биљке, имају знатно бољи антифунгални потенцијал, уз изузетке код сојева *A. niger, A. alternata* и *D. stemonitis*. Изостанак антифунгалног ефекта екстраката биљке *F. ulmaria* на *A. niger* примећен је и у студији Gniewosz *et al.* (2014).[108]

Уопштено, приликом испитивања микродилуционом методом, евидентно је било да су екстракти надземних делова (FUA и FHA) имали бољу укупну антимикробну активност, са нижим MIC вредностима у поређењу са FUR и FHR екстрактима. Како се од раније зна да фенолна једињења играју кључну улогу у процесу антимикробног деловања биљака[351], није изненађујуће што су управо екстракти надземних делова у овом смислу знатно ефикаснији. Спектрофотометријским и хроматографским методама у FUA и FHA екстрактима потврђено је присуство различитих класа фенолних једињења (нарочито флавонола, флавоноида и њихових деривата), за које се зна да поседују изузетна антимикробна својства.[143] Како се многа скорашња истраживања баве управо темом антимикробне активности биљака, доступан је велики број података о антибактеријским и антифунгалним ефектима кверцетина, деривата овог флавоноида (као што је случај са рутином, хиперозидом), кемпферола и многих других фенолних једињења биљног порекла.[143,352,353] Конкретно, у случају кверцетина, поред интеракције са ћелијском мембраном бактерија и повећања њене пермеабилности, још један од механизама деловања овог једињења је инхбиција активности ДНК гиразе бактеријске врсте *E. coli*, али је интересантан и податак да овакав начин деловања остварују флавоноиди са хидроксилованим Б-прстеном, укључујући апигенин.[143,354] Plaper *et al.* (2003)[355] дошли су до закључка да кверцетин, сем везивања за GyrB подјединицу ДНК гиразе *E. coli* инхибира и активност АТПазе. Рутин, дериват кверцетина, има способност инхибиције топоизомеразе типа II и испољава изражено антибактеријско деловање на сој *E. coli*.[143] Поред наведених начина деловања, флавоноидна једињења испољавају и многе друге механизме спречавања раста и развоја микроорганизама (од инхибиције синтезе ћелијског зида, па све до инхибиције енергетског метаболизма).[356] Доступни литературни извори потврђују да је сама антимикробна активност екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* директно повезана са хемијским саставом истих, што се посебно односи на активност испољену ка *E. coli*. Присуство фенолних киселина у поменутим екстрактима надземних делова обе биљке засигурно је допринело њиховој антимикробној активности. Рецимо и то да је гална киселина показала изузетну антибактеријску активност на сојеве G(+) бактерија *S. aureus* и *L. monocytogenes*, као и G(−) бактерија *E. coli* и *P. aeruginosa*.[357] Такође је забележено синергистичко антимикробно деловање различитих класа флавона и флавонола.[143] Од свих група код којих је синергизам уочен, флаван-3-оли су проучени у највећој мери. Галоиловани флаван-3-оли, као што је (-)епикатехин галат, чији су полимери детектовани у испитиваним екстрактима, могу редуковати MIC вредности β-лактамских антибиотика при деловању на метицилин-

резистентни *S. aureus* (MRSA).[356] Код свих фенолних једињења, за антимикробни ефекат су најбитније структурне особине и начин супституисања фенолног прстена (тзв. SAR, *енг.* „Structure-activity relationship“), тако да је, бар код једињења флавоноидног типа, изузетно важна одговарајућа супституција прстена OH-групама и постојање липофилног сегмента, како би антимикробне особине једињења дошле до изражаја.[143,356]

Презентовани резултати антимикробне активности указују да метанолни екстракти надземних делова и корена *F. ulmaria* и *F. hexapetala* имају потенцијалну примену у сврху спречавања развијања микроорганизама, с тим да је потребно јасно дефинисати компоненте које имају најизраженије деловање, па у том смеру дефинисати начин добијања екстраката, као и апликације истих. Неколико микроорганизама коришћених у овом испитивању припадају групи патогена који се развијају у намирницама и који представљају озбиљан ризик по безбедност хране. Већина оваквих патогена, једном унета у ланац исхране, у људском организму може проузроковати нека обољења или реакцију са токсинима које ти патогени продукују.[183] Антимикробни потенцијал испитиваних екстраката може бити искоришћен, у смислу инкорпорације истих у прехрамбене производе склоне загађењу патогенима. С друге стране, способност ових екстраката да инхибирају липидну пероксидацију, указује на двоструки бенефит екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* као природних замена за одржавање квалитета и продужавање рока трајања производа у прехрамбеној или козметичкој индустрији. Утицајем на безбедност таквих производа, могле би се спречити многобројне инфекције и болести код људи.

У овој докторској дисертацији потврђена је још једна изузетно важна, ако не и најважнија, фармаколошка активност испитиваних биљних врста, уз примену мултидисциплинарног приступа и коришћење специфичних *in vitro* и *in vivo* метода. Реч је о антиинфламаторној активности, која у суштини лежи у основи примене биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* у традиционалној медицини. Инфламација јесте комплексан процес где се на месту развијања, неовисно о патолошком стању, у великим количинама синтетишу и накупљају медијатори запаљења, нарочито простагландини.[191] Као што је већ поменуто, значајан механизам антиинфламаторног деловања неке компоненте је инхибиција синтезе простагландина из арахидонске киселине, односно инхибиција ензимске активности циклооксигеназе-1 и -2 (COX-1 и COX-2).[206] Резултати добијени *in vitro* анализом инхибиције активности ова два ензима потврђују да су испитивани екстракти у високом степену инхибирали активност COX-1 и COX-2, што се посебно односи на екстракте надземних делова (FUA и FHA, 50 μg/mL), са око 60% инхибиције COX-1 и чак око 50% инхибиције активности COX-2. Екстракти корена обе биљке су били мање активни када се ради о инхибицији COX-1, али је FHR екстракт испољио највећи проценат инхибиције COX-2 активности, у односу на све тестиране екстракте. У овом случају комплетна биљка *F. hexapetala* показала је бољи антиинфламаторни ефекат у односу на *F. ulmaria*. Међутим, антиинфламаторна активност екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* у врло малом опсегу потиче од способности инхибирања екс-

пресије COX-2 гена, па су други видови антизапаљенског деловања ових биљака вероватно заступљенији. Свакако, требало би узети у обзир и доказано антиоксидативно деловање ових екстраката на NO радикал, који је један од саставних чинилаца антиинфламаторног одговора у организму. Када је реч о *in vitro* антиинфламаторном деловању, постоји известан број публикованих резултата који се односе на екстракте *F. ulmaria*, док је у овом смислу биљка *F. hexapetala* недовољно проучена, па би наши резултати могли представљати основу за даље испитивање ове биљне врсте. Добијени резултати за екстракте *F. ulmaria* су у складу са испитивањима Tunon *et al.* (1995)[79], који су установили да екстракт листа ове биљке инхибира синтезу простагландина и PAF-индуковану егзоцитозу. Друга *in vitro* истраживања сугеришу да *F. ulmaria* може утицати на различите сегменте у процесу инфламације. Vogl *et al.* (2013)[76] показали су да екстракт цвета медунике поседује умерену активност према активацији PPARα и PPARγ, као и да различити екстракти хербе имају умерену до изражену NF-κB инхибиторну активност. Другачији механизми деловања *F. ulmaria* могу бити и смањење производње цитокина, IL-1β, IL-6 и TNF-α[99], утицај на липоксигеназни пут инхибицијом активности 15-LOX [60] или преко имуномодулаторне активности коју су испољили корен, херба и цвет *F. ulmaria*[69].

Међутим, сви наведени резултати *in vitro* испитивања антиинфламаторне активности биљака морају се узети са резервом, јер у *in vitro* анализама не могу бити узете у обзир метаболичке промене једињења у самим екстрактима, које би се свакако догодиле у *in vivo* систему. Отуда је наша намера била да експериментално у *in vivo* условима проверимо и евентуално потврдимо антиинфламаторне ефекте испитиваних екстраката, а базирано на резултатима *in vitro* анализе и литературним подацима везаним за ову тематику. У *in vivo* условима (код експерименталних животиња) долази до метаболичке разградње компонената присутних у екстрактима, па је овај начин испитивања погодан за симулацију одређивања опсега и начина антиинфламаторног деловања у хуманом организму. Две примењене методологије *in vivo* анализе биле су одређивање антиноцицептивне активности и мерење антиедематозног ефекта екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, аплицираних у две концентрације (100 и 200 mg/kg телесне масе). У тесту вруће плоче, који је коришћен за анализу аналгетске активности посредоване централним механизмима (антиноцицептивна активност), одговор који се запажа последица је директне активације ноцицептора топлотом и зависи од супраспиналне интеграције.[299] Екстракти *F. ulmaria* успели су да значајно продуже период латентности на осећај бола изазван термалном стимулацијом, при чему су генерално екстракти надземних делова, како *F. ulmaria*, тако и *F. hexapetala*, имали значајнији антиноцицептивни ефекат у односу на екстракте корена, када се говори о појединачним биљним врстама. Генерално, као знатно ефикаснији, у односу на стандардни лек индометацин, показали су се екстракти биљке *F. hexapetala* у обема концентрацијама, што је донекле у складу и са резултатима *in vitro* анализа до којих смо дошли. Међутим, треба имати у виду значајне разлике у аплицираним концентрацијама екстракта и индометацина. Посебно је интересантна чињеница да се ни у једном случају не може уочити концентрационо зависна антиноцицептивна активност аплицираних екстраката. Други значајан показатељ изузетне антиинфламаторне активности испитиваних биља-

ка у *in vivo* условима јесу резултати антиедематозне активности тј. способности редукције едема изазваног карагенаном (λ), при чему су екстракти аплицирани у идентичним концентрацијама као и у претходном експерименту. Иначе, карагенани (ламбда λ, капа κ и јота ι) представљају сложену групу полисахарида који се састоје од мономера галактозе и имају способност термореверзибилног гелирања. Инјектиран у организам, λ-карагенан изазива акутну, неимунску, запаљенску реакцију уз присуство проинфламаторних агенаса (брадикинина, хистамина, ROS и RNS итд.), праћену развитком едема, болом и црвенилом.[302] Испитивани екстракти су, у скоро свим групама (осим FUA 100 mg/kg), били у стању да смање формирање и развитак едема до 6 h након инјектирања карагенана, у односу на позитивну контролу. На 24 h од иницирања едема сви дефинисани третмани екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala* су ефикасно смањили запремину едема у поређењу са групом која је третирана само карагенаном, уз изузетак значајнијих резултата код третмана FHR екстрактом. У суштини, ток развоја едема изазваног карагенаном у шапама експерименталних животиња може се приказати у облику двофазне криве[358], као што је случај код резултата овог истраживања. У првој фази, која започиње негде око један сат након инјектирања карагенана, ослобађају се хистамин и серотонин. Наредна фаза карактерише се присуством простагландина у инфламаторним ексудатима на месту запаљења, а зна се да они играју пресудну улогу у развитку даље инфламаторне реакције. Максимална запремина едема је у овом истраживању достигнута најчешће на 4 h након третмана карагенаном. Према Vinegar *et al.* (1969)[358], присуство простагландина се може доказати већ на трећем сату мерења едема и у периоду непосредно након тога, тако да су сходно томе и наши резултати потврдили највећи степен инфламације на 3–4 h од индукције. Неке корелације у антиинфламаторним ефектима испитиваних екстраката су примећене у оба *in vivo* теста (антиноцицептивна и антиедематозна активност), посебно код групе третиране FUA (100 mg/kg), док је конкретно антиедематозни потенцијал варирао по фазама, па су неки екстракти били ефикаснији у редукцији едема у првој фази, док се код неких група ниво едема више смањивао у другој фази.

У јединој студији која се, поред оне која је била део ове докторске дисертације, бавила *in vivo* испитивањем антихипералгезијских ефеката ове две биљне врсте, дошло се до закључка да су лиофилизирани инфузи цветова биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* (100–300 mg/kg, *p.o.*), испољили дозно зависну антихипералгезијску активност код хипералгезије изазване инјекцијом карагенана.[333] У истој студији, истраживачка група Samardžić *et al.* (2016)[333] указује да цвет испитиваних биљака у примењеном облику не утиче значајно на смањење карагенаном изазваног едема код експерименталних животиња, али и да токсиколошка студија показује безбедност примене истих са средњом леталном дозом (LD_{50}) преко 2000 mg/kg. Једно *in vivo* истраживање Drummond и сарадника (2013)[100] бавило се испитивањем антиинфламаторног потенцијала новог функционалног производа, који се састојао од водених екстраката камилице, врбе и медунике на добровољним испитаницима. Резултатима је потврђено да ова смеша смањује производњу цитокина (IL-1β, IL-6 и TNFα), смањује бол и побољшава покретљивост и опште стање зглобова. Резултатима многобројних научних истраживања потврђено је да фенолна једињења, од којих је велики број присутан у испитиваним екстрактима,

пре свега фенолне киселине (гална, елагинска и салицилна киселина), флавоноиди (кверцетин, кемпферол, катехин, епикатехин), њихови бројни деривати и други полифеноли, имају изузетан потенцијал као антиинфламаторни агенси.[20,149,159,160,196] Кверцетин и изокверцитрин инхибирају путеве метаболизма арахидоната и утичу на различите регулаторне цитокине и хемокине.[359–361] Катехини испољавају своје антиинфламаторне ефекте кроз регулацију експресије iNOS и COX-2 и супресију проинфламаторних цитокина.[362,363] Свакако, у случају свих испитиваних екстраката *F. ulmaria* и *F hexapetala* највећу пажњу привлачи присуство гаултерина, који се у надземном делу и корену *F hexapetala* налази чак у облику два изомера. Гаултерин је показао изузетне аналгетске и антиинфламаторне ефекте у различитим студијама, аплициран *in vivo* као чисто једињење[139], у облику својих деривата[364] или у облику фракције екстраката зимзелени (*Gaultheria yunnanensis*) која садржи гаултерин у већој количини[365]. Закључци научних испитивања гаултерина су да ово једињење има антиинфламаторну и аналгетску активност сличну аспирину, али без нежељених ефеката на гастроинтестинални тракт које аспирин испољава (настанак лезија и улцерација, услед инхибиторног деловања аспирина на COX-1 из желудачног епитела, који има улогу у синтези цитопротективних простагландина). Гаултерин хидролизом до метил салицилата, а потом деловањем естераза у цревима, крви и јетри, ослобађа свој активни састојак, салицилну киселину, знатно спорије и обезбеђује ефективну концентрацију у дужем временском периоду, без наглог пораста њене количине. Стога, салицилна киселина не утиче на активност COX-1 у желуцу, јер се не ослобађа у том делу дигестивног тракта, па тако и не изазива нежељене ефекте.[139,140,364] Дакле, базирано на хемијском саставу екстраката *F. ulmaria* и *F hexapetala*, испољени антиинфламаторни потенцијал у примењеним тестовима потврђује оправданост употребе ових биљака у европској традиционалној медицини у третману инфламаторних обољења. Као што је већ напоменуто, у људском организму долази до метаболичких промена фенолних конституената из биљних екстраката, тако да је, ради потпуног разумевања механизма антиинфламаторног деловања, неопходно усмерити даља истраживања у правцу утврђивања начина метаболисања активних конституената и да ли добијени метаболити и на који начин утичу на механизам антиинфламаторног деловања екстракта као целине.

Према литературним подацима, обе испитиване биљке, и *F. ulmaria* и *F hexapetala* коришћене су у традиционалној медицини европских народа у третманима обољења бубрега.[50,53,113,116] Стога је један од задатака постављених у оквиру рада на овој докторској дисертацији био експериментално потврдити оправданост оваквог вида употребе ове две биљне врсте из рода *Filipendula*. У те сврхе коришћен је *in vivo* модел испитивања (албино пацови из соја Wistar), а експеримент је дефинисан тако да се на мултидисциплинарни начин може доћи до најбитнијих чињеница и резултата који би указивали на *in vivo* ефекте испитиваних екстраката биљака *F. ulmaria* и *F hexapetala,* у стању интоксикације агенсом за који је познато да, у првом реду, утиче на морфологију и физиологију бубрега. За изазивање токсичности коришћена је цисплатина, лек који је тренутно један од најефективнијих цитостатичких агенаса у третману широког спектра

тумора чврсте конзистенције, укључујући канцер врата и главе, плућа, јајника и тестиса, бешике, цервикса и ендометријума.[366,367] Терапеутски ефекти цисплатине на ћелије тумора одвијају се, између осталог, преко реактивним врстама кисеоника (ROS)-посредоване индукције апоптозе.[368] Упркос чињеници да се цисплатина користи клинички већ скоро четрдесет година, као део третмана поменутих малигнитета, нежељени ефекти овог лека, посебно нефротоксичност, ототоксичност и хепатотоксичност, су и даље неизбежни.[234,369] Јетра, као најважнији орган за детоксикацију у организму, прва је погођена токсичним споредним ефектима многих лекова, па је управо хепатотоксичност чест проблем повезан са метаболизмом цисплатине.[219,370] Ипак, најчешћи нежељени ефекат повезан са третманом цисплатином је нефротоксичност. У процесу реналне екскреције цисплатине, бубрег акумулира високе ефективне концентрације овог једињења, што може проузроковати апоптозу или некрозу ткива, у зависности од времена изложености и концентрације цисплатине.[227,234] Научна истраживања потврдила су да су оксидативни и нитрозативни стрес главни механизми у основи настанка *in vivo* токсичности изазване цисплатином.[225,227] Многе скорашње студије баве се управо ефектима уноса антиоксиданата на смањење токсичности и нежељених ефеката у организму индукованих цисплатином.[249,371–374] Стога је и наш циљ био испитати утицај екстраката надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* и *F hexapetala* аплицираних у три различите дозе (100, 200 и 400 mg/kg телесне масе) на негативне ефекте цисплатине у *in vivo* условима.

Резултати испитивања параметара серума експерименталих животиња јасно су показали да је једна доза цисплатине (7.5 mg/kg т.м., *i.p.*) резултирала истакнутим погоршањем функција јетре и бубрега. Трансаминазе, локализоване у цитоплазми хепатоцита, ослобађају се у крвоток након оштећења ћелија тако да их ова особина чини најосетљивијим маркерима за одређивање целуларног оштећења и токсичности.[239] Трансаминазе у серуму (ALT и AST), као и други параметри серума (ALP и γGT) повезани са нормалном функцијом јетре, били су значајно повећани у серуму групе животиња третираних само цисплатином. Бубрежна дисфункција развија се неколико дана након третмана цисплатином и карактерише се повећањем концентрације креатинина и урее у серуму.[239] У нашим испитивањима, нивои три главна параметра функције бубрега, креатинина, мокраћне киселине и урее, знатно су порасли у групи третираној само цисплатином. Ови параметри свакако указују на развој цисплатином индуковане нефротоксичности, како је наведено у многим недавним налазима.[371,373,375] Штавише, наши резултати показали су да цисплатина изазива значајно смањење телесне масе животиња на крају експеримента. Један од кључних разлога за овакве резултате телесне масе може бити дисфункција гастроинтестиналног тракта, дехидратација, редукција апетита, повећан катаболизам и настанак реналних тубуларних озледа.[371,376]

Оксидативни стрес, као што је већ поменуто, представља један од најзначајнијих механизама укључених у процес развоја токсичности цисплатине. Под нормалним физиолошким условима, синтеза и елиминација ROS у ћелијама контролисана је ендогеним антиоксидантним системима (каталаза - CAT, супероксид дисмутаза - SOD и редуковани глутатион - GSH). Међутим, ако су нивои ROS знатно повишени, многе

ћелијске структуре, које укључују примарне биомолекуле типа протеина, липида и ДНК, могу бити оштећене, тако да ROS играју одлучујућу улогу у патогенези токсичности цисплатине.[225,239] Како се молекули цисплатине могу ковалентно везати за протеине, то може даље утицати на структуре антиоксидативних ензима и тиме инхибирати ензимску активност, пре свега CAT и SOD, ензима који делују као прва линија одбране при било ком оксидативном оштећењу ћелија. Други могућ механизам којим цисплатина редукује ниво антиоксидативних ензима је смањење експресије SOD и CAT гена.[375] Један од најважнијих конституената неензимске одбране од оксидативног стреса је редуковани глутатион (GSH). GSH је укључен у процес регулације пермеабилности унутрашње митохондријалне мембране и ензимску функцију, тако што одржава SH-групу у редукованом стању и тиме обезбеђује протон за антиоксидантне ензиме. Праћење нивоа GSH је изузетно важно код третмана цисплатином, јер је ово једињење јако реактивно и има тенденцију формирања комплекса са молекулима који садрже тиолну групу, као што је случај управо са GSH. Конјугација цисплатине са GSH смањује његову концентрацију и води ка настанку митохондријалног оксидативног стреса, као једног сегмента токсичности цисплатине.[225,239] Још крајем 80-тих година прошлог века доказано је да је цисплатина, као једињење, у могућности да гради CP-GSH-конјугате, који су тада изоловани из ћелија и серума експерименталних животиња третираних цисплатином.[377] Тиобарбитурна киселина-реактивне супстанце (TBARS), као нуспродукт липидне пероксидације изазване оксидативним стресом, су неопходне за утврђивање нивоа ROS-индукованих оштећења у организму.[378–380] Недавна истраживања сугеришу да, слободни радикали које генерише цисплатина, могу реаговати са мембранским липидима, при чему долази до формирања липидних пероксида.[371,375] А још један од главних продуката липидне оксидације јесте и малондиалдехид (MDA), у чијим се еквивалентима најчешће одређује ниво TBARS као индикатора оксидативног стреса.[378] Из резултата добијених у нашој студији види се, кроз нивое свих испитиваних маркера оскидативног стреса (CAT, SOD, GSH и TBARS), у ткивима бубрега и јетри пацова третираних само једном дозом цисплатине, да је цисплатина имала негативан утицај на оксидативни статус ових органа. Резултати активности антиоксидантних ензима истичу у први план поремећај функције јетре и бубрега услед третмана цисплатином. Као што је и очекивано, концентрација GSH у бубрезима и јетри је била екстремно редукована, што се може приписати комплексирању молекула GSH са цисплатином. Поврх тога, третман цисплатином довео је и до повећања нивоа TBARS и липидне пероксидације у ткивима бубрега и јетре. Ови резултати су свакако у корелацији са подацима многих истраживачких група, које су потврдиле да је оксидативни стрес главни разлог токсичних ефеката цисплатине, јер изазива смањење количине GSH, праћено повећањем нивоа неких маркера оксидативног стреса, TBARS, хепатичких трансаминаза и редукцијом ензимске активности CAT и SOD.[225,235,248,371,373,381–383]

Резултати испитивања параметара оксидативног стреса у серуму и ткивима и анализа оштећења ткива бубрега и јетри експерименталних животиња, које су третиране са три дефинисане дозе метанолних екстраката надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* (FUA и FUR) и *F. hexapetala* (FHA и FHR), током 10 узастопних дана, уз једну дозу цисплатине (петог дана третмана), указују на значајно повољно дејство

аплицираних екстраката у односу на групу која је третирана само са цисплатином. Испитивани екстракти су значајно побољшали функцију јетре и бубрега, која је била нарушена примењеном дозом цисплатине, а то је и окарактерисано смањењем ослобађања хепатичких ћелијских ензима у циркулацију и нормализацијом функције бубрега преко регулације нивоа урее и мокраћне киселине. Посебно је значајна стабилизација структуре хепатичке ћелијске мембране од стране екстраката и превенција излажења интраћелијских ензима. Третман екстрактима је био у стању да значајно смањи параметре серума, у неким случајевима на дозно завистан начин. Екстракти су, поред тога, у великој мери уравнотежили оксидативни статус у ткивима бубрега и јетре повећањем активности CAT и SOD, али и смањењем липидне пероксидације и концентрације TBARS. Такође, сви испитивани екстракти, у примењеним концентрацијама, били у стању да спрече смањење нивоа GSH у ткиву јетре настало због третмана цисплатином. Ипак, у бубрезима је GSH био елемент антиоксидативне одбране под највећим утицајем токсичних особина цисплатине, при чему је вероватно дошло до формирања коплекса CP-GSH. Једино је FUA екстракт у највишој дози био у могућности да одржи ниво GSH у бубрежном ткиву у границама нормале, посматрано у односу на негативну контролну групу. Закључак који се може извести из добијених резултата је да испитивани екстракти *F. ulmaria* и *F. hexapetala* показују знатно израженији ефекат у превенцији и сузбијању развитка оксидативног стреса индукованог цисплатином у ткиву јетре, него што је то случај у реналном ткиву. Иако прецизан механизам нефротоксичности цисплатине и даље није потпуно разјашњен, познато је да бубрези акумулирају много веће концентрације цисплатине, у односу на остала ткива и органе, посебно проксимални тубули бубрега због мембранских транспортера који су ту локализовани.[239] Индукција нефро- и хепатотоксичности цисплатине, дефинисана на основу детерминације нивоа биохемијских параметара у серуму и ткивима, потврђена је и резултатима хистолошких анализа ткивних препарата бубрега и јетри третираних животиња. Цисплатина је изазвала обимне морфолошке промене у посматраним ткивима, док су екстракти *F. ulmaria* и *F. hexapetala* испољили протективни ефекат кроз смањење и ублажавање степена хистопатолошких параметара. Међутим, мора се истаћи и да су најбезбедније биле ниже дозе екстраката, јер је на ткивним препаратима животиња из група третираних само екстрактима у највишој дози (400 mg/kg т.м.) уочено развијање извесних мофролошких промена слабог до средњег интензитета. Дакле, испитивани екстракти испољавају најефикаснију заштиту ткива, у нижим дозама, уз значајну редукцију оштећења реналног и хепатичког ткива изазваног цисплатином. Хепатопротективни ефекти испитиваних биљних врста потврђени су у неколико научних студија. Тако су Ćebović и Maksimović (2012)[120] показали хепатопротективно дејство екстракта цвета *F. hexapetala* код оштећења јетре индукованог угљен тетрахлоридом, где је третман овим екстрактом утицао на значајно повећање нивоа антиоксидативних параметара у ткиву јетре експерименталих животиња, што је свакако у корелацији са нашим резултатима. Такође, у стању хепатотоксичности изазване истим агенсом код експерименталних пацова, Shilova *et al.* (2006, 2008)[92,105] су потврдили да екстракт и фракције надземног дела биљке *F. ulmaria* утичу повољно на регулацију свих параметара оксидативног стреса у ткиву јетре и крвној плазми.

У претходној *in vitro* анализи цитотоксичности ових екстраката, није била детектована цитотоксична активност ни *F. ulmaria* нити *F. hexapetala* екстраката у концентрацији до 50 μg/mL, на ћелијским линијама U251, HCT-116 и MRC-5. Из тог разлога, можемо претпоставити да испитивани екстракти у сваком случају не би имали синергистички цитотоксични ефекат са цисплатином. С друге стране, неки литературни подаци указују на изузетан цитотоксични потенцијал екстраката цвета *F. ulmaria* и *F. hexapetala* на раст хуманих лимфобластоидних „Raji" ћелија[102], као и инхибицију пролиферације NCI-H460 туморских ћелија помоћу екстракта цвета *F. ulmaria*.[53]

Постоји неколико могућих механизама преко којих испитивани екстракти испољавају своје протективно дејство у живом организму. Један од њих је свакако одбрана од оксидативног стреса.[227] Многе скорашње студије сугеришу да фенолна једињења биљног порекла, као и биљни екстракти, имају различите биолошке особине, посебно као антиоксиданти у различитим стањима и обољењима која у својој основи имају оксидативни стрес.[177] Поред антиоксидативног потенцијала, јасно је да фенолна једињења показују низ позитивних фармаколошких ефеката. Рецимо, катехини и процијанидини (кондензовани танини), који су детектовани LC-MS анализом у свим екстрактима, поседују низ корисних ефеката на здравље.[334–337] Биолошке особине епикатехина су јако добро испитане, а позитивни ефекти овог једињења заснивају се на превенцији оштећења у стањима оксидативног стреса *in vivo* и укључењу у ћелијску сигнализацију.[384,385] Такође, хидролизабилни танини поседују различите биолошке активности засноване на антиоксидативним и антиканцерогеним особинама.[138,386] Још једна фармаколошки изузетно активна група фенолних једињења идентификованих у екстрактима, првенствено надземних делова, испитиваних биљака јесу флавоноиди и флавоноидни гликозиди, већином гликозиди кверцетина (спиреозид, хиперозид, рутин, кверцитрин и изокверцитрин). Кверцетин је флавоноид добро познат по свом *in vivo* антиоксидативном потенцијалу, који укључује и хепатопротективну активност.[387] Sanchez-Gonzalez *et al.* (2011)[388] показали су да кверцетин поседује и нефропротективну активност код токсичности индуковане управо цисплатином, при том не нарушавајући њену антитуморску активност. Један од гликозида кверцетина, кверцитрин, такође је показао антиоксидативно дејство *in vitro* и побољшао *in vivo* антиоксидативни статус експерименталних животиња.[389,390] Када говоримо о *in vivo* ефектима хиперозида, Choi *et al.* (2011)[391] документовали су да је ово једињење испољило хепатопротективну активност код оштећења јетре индукованог угљен тетрахлоридом (CCl_4), и то преко антиоксидативних механизама. Arjumand *et al.* (2011)[250] показали су да је рутин, као већ потврђени ефикасни антиоксидант, успео да ублажи инфламацију бубрега индуковану цисплатином и смањи оксидативни стрес. Такође, изокверцитрин показује широк спектар позитивних биолошких ефеката *in vitro* и *in vivo*, посебно хемопротективну активност у стањима оксидативног стреса, тумора и кардиоваскуларних поремећаја.[392] Фенолне киселине представљају још једну класу биолошки активних једињења идентификованих у испитиваним екстрактима. Гална киселина је показала изузетне особине у *in vivo* условима, које се огледају у спречавању раста неких типова тумора[393,394] и супресији оксидативног стреса[395], док су Yüce *et al.* (2007)[396] доказали да елагинска ки-

селина утиче на превенцију оксидативног стреса изазваног цисплатином у ткивима јетре и срца.

Дакле, способност фитојединења фенолног типа да делују као јаки антиоксиданти, а која потиче од њихове хемијске структуре, од изузетног је значаја за потенцијалну *in vivo* апликацију ових једињења или препарата. Њихова могућност да реагују са слободним радикалима, активирају ензиме антиоксидативне одбране, хелатација метала, инхибирање активности оксидаза, као и повећање антиоксидативних особина једињења мале молекулске масе, чини их изузетно погодним избором за третман оксидативног стреса и његових последица.[142,155,171] Обећавајућа антиоксидативна активност екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* је претходно доказана применом *in vitro* метода, а фитохемијском карактеризацијом проучаваног материјала, помоћу више хроматографских и спектрофотометријских метода, потврђено је присуство широког спектра фенолних једињења, за које је показано да делују као антиоксиданти. Наши резултати серумских и ткивних биохемијских параметара јасно имплицирају да испитивани биљни екстракти штите од цисплатином изазване токсичности јетре и бубрега посредством антиоксидативне активности. Поред наведеног антиоксидативног механизма заштите метанолних екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, други потенцијални протективни механизам, код цисплатином индукованог оксидативног стреса, је заснован на традиционално и научно доказаној антиинфламаторној активности ових биљних врста[76,99,100,333], која је потврђена и у оквиру ове докторске дисертације. Оксидативни стрес индукован цисплатином води ка активацији проинфламаторних медијатора и развитку запаљења у организму,[239] тако да антиинфламаторно дејство фитојединења и екстраката може умногоме допринети супресији штетних ефеката цисплатине. Поред резултата ове докторске дисертације, многобројна научна истраживања показала су протективне ефекте различитих биљних екстраката на процесе нефро- и хепатотоксичности изазване администрацијом цисплатине.[246,248,397] Биљни екстракти богати полифенолима, као што су екстракт ризома ђумбира (*Zingiber officinale*)[246], екстракт хербе камилице (*Matricaria chamomilla*)[398] и стандардизовани екстракти као силимарин[399] и жен-шен[374], испољили су значајне заштитне ефекте код хепато-, ото- и/или нефротоксичности цисплатине *in vivo*.

Још један од могућих заштитних механизама екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* у стању токсичности индуковане цисплатином може бити сузбијање оштећења ДНК ланаца у нормалним ћелијама. Цисплатина може реаговати са бројним структурама у ћелији, али најважније интрацелуларне мете овог антитуморског лека јесу молекули ДНК. Верује се да је оштећење ДНК главни окидач заустављања ћелијског циклуса и, на крају, апоптозе. Цисплатина је показала индукцију апоптозе у више типова ткива.[229] Такође, употреба цисплатине у хемиотерапији канцера повећава могућност формирања и развоја секундарних малигнитета, услед њене високе мутагене способности.[400] Иако је антинеопластични ефекат цисплатине посредован везивањем за једарну ДНК, цисплатина такође изазива оштећења митохондријалне ДНК.[239] На основу истраживања групе Brozovic *et al.* (2011)[400], може се закључити да цисплатина индукује велика генетска оштећења и значајан степен генотоксичности, нарочито у

ћелијама јетре и бубрега. Резултати испитивања генотоксичности у нашим *in vivo* експериментима, указују на присуство значајног оштећења ДНК индукованог цисплатином у ћелијама јетре и, нарочито, ћелијама бубрега. Такође, резултати истичу да је проценат редукције оштећења ДНК у бубрезима и јетри знатно порастао при третману са цисплатином и испитиваним екстрактима, при чему су ниже дозе екстраката (100 и 200 mg/kg т.м.) биле много ефикасније у свом антигенотоксичном деловању у односу на највишу примењену дозу (400 mg/kg). Екстракти у највећој концентрацији нису били у могућности да смање генотоксичност цисплатине, у неким случајевима су те вредности чак и повећане, а екстракти аплицирани самостално у овој дози су такође имали извесну генотоксичност, иако знатно нижу од саме цисплатине. До сада нису објављена научна истраживања која би се бавила ко-генотоксичношћу *F. ulmaria* и *F. hexapetala* екстраката, али су Patenković *et al.* (2013)[401], користећи SMART тест на моделу организама *Drosophila melanogaster*, установили да водени инфуз биљке *Gentiana lutea* L. има когенотоксичан ефекат са метил метансулфонатом (MMS), што имплицира да екстракти неких биљака могу повећати негативне ефекте генотоксичних агенаса. Међутим, наша истраживачка група је недавно установила да су исти екстракти *F. ulmaria* и *F. hexapetala* испитивани у оквиру рада на овој докторској дисертацији били лишени генотоксичног деловања и чак су успели да у великој мери спрече оштећења ДНК индукована хидроксил радикалом.[402] Такође, скорија истраживања групе Sinha *et al.* (2015)[371] показала су да неки биљни препарати могу заштитити ћелије од ДНК оштећења изазваних цисплатином, захваљујући својој способности неутрализације слободних радикала.

Упркос свим обећавајућим резултатима овог *in vivo* испитивања третмана екстрактима надземног дела и корена *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, уз једну дозу цисплатине као токсичног агенса, постоји извесна бојазан везана за неке резултате хистопатолошке и генотоксичне анализе код животиња третираних највишом дозом ових екстраката. Стога, посебну пажњу треба посветити начину дозирања испитиваних екстраката у сврху њиховог коришћења за спречавање или смањење токсичности цисплатине. Ипак, без обзира на то, добијени резултати потврђују значајно протективно дејство метанолних екстраката надземних делова и корена *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, посебно у нижим примењеним концентрацијама, у стањима токсичности настале услед уноса цисплатине у организам.

Закључак

7

У оквиру ове докторске дисертације извршена је фитохемијска, биохемијска и фармаколошка карактеризација метанолних екстраката надземних и подземних делова (хербе и корена) медунике (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и суручице (*Filipendula hexapetala* Gilib.). На основу добијених резултата примењених анализа могу се извести следећи закључци:

- Прелиминарна фитохемијска испитивања биљних екстраката помоћу спектрофотометријских метода показала су да сви екстракти поседују висок садржај укупних фенолних једињења. Екстракти надземних делова обе биљне врсте били су доминантно богатији флавоноидима и флавонолима, док су екстракти корена имали знатно веће количине кондензованих танина и галотанина. Хроматографским техникама у екстрактима *F. ulmaria* и *F. hexapetala* потврђено је присуство широког спектра фенолних једињења, која припадају класама фенолних киселина, флавоноида и танина, као и деривата ових једињења. У екстракту надземног дела *F. hexapetala* детектован је флавоноид кверцетин, док је у надземним деловима обе испитиване биљке идентификован велики број деривата овог флавоноида, међу којима је и спиреозид, референтно једињење за стандардизацију ових биљних врста. Већина флавоноидиних једињења је у знатно већој количини квантификована у надземном делу *F. hexapetala*, у поређењу са екстрактом надземног дела *F. ulmaria*. У екстрактима, посебно корена обе биљне врсте, забележено је присуство процијанидина који се састоје од остатака (епи)катехина и (епи)афзелехина. Што се тиче фенолних киселина, поред галне и елагинске киселине и њихових деривата који су детектовани у свим екстрактима, салицилна киселина детектована је само у надземном делу *F. hexapetala*. Салицилати, по којима су познате и медуника и суручица, били су присутни само у облику гаултерина у свим испитиваним биљним екстрактима, али у нешто већој количини у надземним деловима ових биљака.
- Резултати испитивања антиоксидативне активности екстраката ових биљака у *in vitro* условима воде до закључка да они поседују изузетан антиоксидативни потенцијал и антирадикалску активност (уз изостајање хелатационих способности), што се може приписати великом садржају полифенола, као познатих ефикасних антиоксиданата. Добијене вредности не прате идентичан тренд, тако да су, у неким случајевима, екстракти једне биљке доминирали својом антиоксидативном активношћу у односу на другу биљку. Исто важи и на нивоу биљних органа, па рецимо да су екстракти корена обе биљке имали већу укупну антиоксидативну активност од надземних делова, док су се, с друге стране, екстракти надземних делова одликовали бољом неутализацијом слободних радикала и спречавањем липидне пероксидације. Добијене вредности антиоксидативног потенцијала екстраката биле су упоредиве са познатим природним антиоксидантима, као што су кверцетин, рутин, гална и елагинска киселина, и синтетичким антиоксидантом БХТ-ом. Испитивања стабилности екстраката

показала су да су они прилично стабилни на различитим pH вредностима и при термичком третирању, што имплицира њихову могућу употребу у различитим дијететским препаратима, прехрамбеним и фармацеутским формулацијама, без значајног губитка антиоксидативне активности. Такође, резултати стабилности су дали значајан допринос у разумевању понашања и деловања екстраката у току и након процеса *in vitro* дигестије, што је била основа за *in vivo* испитивања фармаколошке активности.

- Екстракти *F. ulmaria* и *F. hexapetala* су испољили добре антимикробне особине, при чему је антибактеријска активност била много израженија у односу на деловање испитиваних екстраката као антифунгицида. Бактеријске врсте *E. coli* (ATCC 25922), *M. lysodeikticus* (ATCC 4698), и изолати *S. aureus* (FSB 30), *E. faecalis* (FSB 24) су били најосетљивији на деловање екстраката, док су најјаче антифунгално деловање показали екстракт надземног дела *F. hexapetala* у третману гљиве *F. oxysporum* и корен исте биљке у третману гљиве *P. fastigiata*.
- Приликом *in vitro* испитивања антипролиферативне активности екстраката утврђено је да они, чак и при највишој примењеној концентрацији од 50 μg/mL, не испољавају цитотоксичне особине, како на ћелијским линијама канцера (хумана ћелијска линија канцера дебелог црева (HCT-116), хумана ћелијска линија глиобластома (U251)), тако и на нормалној ћелијској линији (хумана ћелијска линија фибробласта плућа (MRC-5)).
- Испитивање антиинфламаторне активности екстраката *F. ulmaria* и *F. hexapetala* *in vitro* и *in vivo*, које је базирано на традиционалној употреби ових биљака у народној медицини, довело је до закључка да екстракти показују изузетан антиинфламаторни ефекат који се огледа у способности екстраката да инхибирају ензимску активност циклооксигеназа (COX-1 и посебно COX-2) *in vitro*, при чему немају превеликог утицаја на експресију COX-2 гена. У инхибицији ензима COX-1 примат су имали екстракти надземних делова испитиваних биљака, док је код инхибирања COX-2, поред надземних делова, највећи утицај испољио екстракт корена *F. hexapetala*. Екстракти су и у *in vivo* условима испољили свој антиинфламаторни потенцијал, при чему су екстракти биљке *F. hexapetala* предњачили бољом антиноцицептивном и антиедематозном активношћу.
- Резултати *in vivo* испитивања показали су да је ко-третман метанолним екстрактима надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, примењених у три различите концентрације (100, 200 и 400 mg/kg), испољио протективне ефекте код експерименталних животиња у стању оксидативног стреса индукованог цисплатином. Третманом екстрактима смањена је нефро- и хепатотоксичност изазвана цисплатином, регулисани су биохемијски параметри у серуму и ткивима бубрега и јетре везани за оксидативни стрес и оштећења ткива, док су са друге стране екстракти помогли у очувању нормалне грађе ткива поменутих органа. Поред тога, екстракти су у нижим дозама довели до смањења генотоксичних ефеката цисплатине у ткивима бубрега и јетре. Стога се може закључити да се испитивани екстракти могу користити као помоћни агенси код пацијената

са карциномом који примају терапију цисплатином, за побољшање одбране организма од оксидативног стреса и смањење споредних токсичних ефеката цисплатине.

- Највећа концентрација екстраката аплицирана у *in vivo* експерименту са цисплатином *per se* (400 mg/kg) изазвала је промене биохемијских параметара нормалне функције бубрега и јетре и повећање хистолошких и ДНК оштећења у ћелијама ових органа, али је у исто време ова концентрација, у случају скоро свих екстраката, показала најбоље *in vivo* антиоксидативне ефекте. Ови резултати указују на то да штетно (прооксидативно) дејство испитиваних екстракта у већим концентрацијама превазилази њихов корисни ефекат као антиоксиданата и да треба узети у обзир употребу мањих доза у потенцијалним котретманима са цисплатином.

На крају, на основу свега изложеног, може се закључити да ова докторска дисертација, по први пут, научној јавности даје детаљан, упоредни, увид у фитохемијски састав екстраката надземних делова и корена биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, као и количину појединих фенолних једињења у њима. Такође, испитани фармаколошки ефекти представљају један од значајних прилога познавању бројних биолошких активности које ове биљке поседују, а које су пре свега повезане управо са њиховим хемијским саставом. Ова студија указује да се екстракти надземних делова и корена две испитиване биљке, као извори антиоксидативних и антимикробних супстанци, потенцијално могу користити као додаци или чиниоци разних дијететских и фармацеутских производа, ради побољшавања њихових својстава, али и бројних бенефита за здравље човека. Поред тога, доказана антиинфламаторна активност ових биљака може послужити за развијање нових формулација или фитопрепарата, који би се могли користити за спречавање и ублажавање запаљенских реакција у организму. Ови резултати додатно потврђују употребу биљака *F. ulmaria* и *F. hexapetala* у традиционалној медицини европских народа за лечење инфламаторних обољења, као и да се *F. ulmaria* у третманима може успешно заменити са *F. hexapetala*. Узимајући у обзир протективне ефекте екстраката ових биљака у стању оксидативног стреса изазваног цисплатином, можемо претпоставити да је читав спектар фармаколошких ефеката екстраката, одговоран за заштиту организма од оваквог вида оштећења. Неке од најзначајнијих особина које препоручују екстракте *F. ulmaria* и *F. hexapetala* за адјувантну терапију при коришћењу цисплатине за лечење рака су антиоксидативни, антиинфламаторни и антигенотоксични ефекти. Међутим, за потпуно разумевање начина деловања, као и безбедну примену биљних екстраката, морају се размотрити и, у будућности, додатно испитати метаболизам биљних састојака и метаболичке реакције у биолошким системима (ћелијама), као и одредити одговарајућа терапеутска доза која не би имала нежељених ефеката у *in vivo* условима.

Литература

8

1 W. C. Evans, *Trease & Evans Pharmacognosy*, Elsevier (A Division of Reed Elsevier India Pvt. Limited), 15th edn., 2002.
2 P. J. Houghton and P. K. Mukherjee, *Evaluation of Herbal Medicinal Products*, Pharmaceutical Press, London, 2009.
3 H. Wagner, *Pure Appl. Chem.*, 2005, **77**, 1–6.
4 R. Fürst and I. Zündorf, *Planta Med.*, 2015, 962–967.
5 D. Parojčić and D. Stupar, *Timočki Med. Glas.*, 2003, **28**, 101–109.
6 P. De Vos, *J. Ethnopharmacol.*, 2010, **132**, 28–47.
7 A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E.-M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E. H. Heiss, J. M. Rollinger, D. Schuster, J. M. Breuss, V. Bochkov, M. D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V. M. Dirsch and H. Stuppner, *Biotechnol. Adv.*, 2015, **33**, 1582–614.
8 S. Bullock, *Fundamentals of pharmacology*, Pearson Australia, 7th edn., 2014.
9 D. A. Dias, S. Urban and U. Roessner, *Metabolites*, 2012, **2**, 303–336.
10 A. Gurib-Fakim, *Mol. Aspects Med.*, 2006, **27**, 1–93.
11 G. M. Cragg and D. J. Newman, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2013, **1830**, 3670–3695.
12 Y. S. Jaiswal and L. L. Williams, *J. Tradit. Complement. Med.*, 2017, **7**, 50–53.
13 E.-M. Pferschy-Wenzig and R. Bauer, *Epilepsy Behav.*, 2015, **52**, 344–362.
14 H. Lülman, K. Mohr, L. Hein and D. Bieger, *Color Atlas of Pharmacology*, Thieme, Stuttgart, New York, 3rd edn., 2005.
15 S. Jarić, M. Mitrović, L. Djurdjević, O. Kostić, G. Gajić, D. Pavlović and P. Pavlović, *J. Ethnopharmacol.*, 2011, **137**, 601–619.
16 M. S. Butler, *Nat. Prod. Rep.*, 2005, **22**, 162.
17 T. Efferth, *Chin. J. Nat. Med.*, 2011, **9**, 1–6.
18 B. David, J.-L. Wolfender and D. A. Dias, *Phytochem. Rev.*, 2015, **14**, 299–315.
19 A. L. Harvey, *Drug Discov. Today*, 2008, **13**, 894–901.
20 B. B. Mishra and V. K. Tiwari, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 4769–4807.
21 M. J. Balunas and A. Douglas Kinghorn, *Life Sci.*, 2005, **78**, 431–41.
22 K. S. Lam, *Trends Microbiol.*, 2007, **15**, 279–289.
23 A. D. Kinghorn, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001, **53**, 135–148.
24 D. J. Newman and G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, 2016, **79**, 629–661.
25 M. S. Butler, A. A. B. Robertson and M. A. Cooper, *Nat. Prod. Rep.*, 2014, **31**, 1612–1661.
26 J. David Phillipson, *Phytochemistry*, 2001, **56**, 237–243.
27 N. Dhami and A. D. Mishra, *J. Herb. Med.*, 2015, **5**, 118–127.
28 S. Govindaraghavan and N. J. Sucher, *Epilepsy Behav.*, 2015, **52**, 363–371.
29 T. Efferth and M. Volm, *Pharmacol. Ther.*, 2005, **107**, 155–176.
30 C. Seger, S. Sturm and H. Stuppner, *Nat. Prod. Rep.*, 2013, **30**, 970–987.
31 R. D. Hall, *New Phytol.*, 2006, **169**, 453–468.
32 K. Ardjomand-Woelkart and R. Bauer, *Planta Med.*, 2015, 82, 17–31.
33 Q. Zhang, H. Yang, J. An, R. Zhang, B. Chen and D.-J. Hao, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2016, **2016**, 1–18.
34 G. Yang, Y. Wang, J. Sun, K. Zhang and J. Liu, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2015, **16**, 520–528.
35 O. Potterat and M. Hamburger, *Nat. Prod. Rep.*, 2013, **30**, 546–64.
36 V. K. Devi, N. Jain and K. S. Valli, *Pharmacogn. Rev.*, 2010, **4**, 27–31.
37 H. Mirzaei, A. Shakeri, B. Rashidi, A. Jalili, Z. Banikazemi and A. Sahebkar, *Biomed. Pharmacother.*, 2017, **85**, 102–112.
38 S. Foss Hansen, L. Roverskov Heggelund, P. Revilla Besora, A. Mackevica, A.

Boldrin and A. Baun, *Environ. Sci. Nano*, 2016, **3**, 169–180.
39 L. Y. Kong and R. X. Tan, *Nat. Prod. Rep.*, 2015, **32**, 1617–1621.
40 M. Josifović, *Flora of Serbia I-X*, Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia, 1973.
41 D. Potter, T. Eriksson, R. C. Evans, S. Oh, J. E. E. Smedmark, D. R. Morgan, M. Kerr, K. R. Robertson, M. Arsenault, T. A. Dickinson and C. S. Campbell, *Phylogeny and classification of Rosaceae*, 2007, vol. 266.
42 E. K. Hummer and J. Janick, *Rosaceae: Taxonomy, Economic Importance, Genomics*, Springer Science+Business Media B.V., 2009.
43 K. Šavikin, G. Zdunić, N. Menković, J. Živković, N. Ćujić, M. Tereščenko and D. Bigović, *J. Ethnopharmacol.*, 2013, **146**, 803–810.
44 T. Shimizu, *J. Fac. Text. Sci. Technol.*, 1961, **26**, 1–31.
45 R. Giebelmann, 2004, **71**, 54–63.
46 I. Schanzer, *J. Japanese Bot.*, 1994, **69**, 290–319.
47 S. Lee, M. Kang, K. I. Heo, W. L. Chen and C. Lee, *J. Syst. Evol.*, 2009, **47**, 115–122.
48 S. Jarić, Z. Popović, M. Mačukanović-Jocić, L. Djurdjević, M. Mijatović, B. Karadžić, M. Mitrović and P. Pavlović, *J. Ethnopharmacol.*, 2007, **111**, 160–175.
49 D. N. Olennikov and M. Y. Kruglova, *Chem. Nat. Compd.*, 2013, **49**, 610–616.
50 J. Tucakov, *Lečenje biljem*, Izdavačka radna organizacija RAD, Beograd, 1984.
51 L. Barros, L. Cabrita, M. V. Boas, A. M. Carvalho and I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem.*, 2011, **127**, 1600–1608.
52 E. A. Krasnov, V. A. Raldugin, I. V Shilova and E. Y. Avdeeva, *Chem. Nat. Compd.*, 2006, **42**, 122–124.
53 M. J. Lima, D. Sousa, R. T. Lima, A. Maria, I. C. F. R. Ferreira and M. H. Vasconcelos, *Ind. Crop. Prod.*, 2014, **59**, 149–153.
54 E. Pemp, G. Reznicek and L. Krenn, *J. Anal. Chem.*, 2007, **62**, 745–749.
55 I. V Shilova, A. A. Semenov, N. I. Suslov, E. I. Korotkova, A. N. Vtorushina and V. V Belyakova, *Pharm. Chem. J.*, 2009, **43**, 4–9.
56 M. Pitts, *Br. Archaeol.*, 2006, **66**, 6.
57 S. B. A. Halkes, C. J. Beukelman, B. H. Kroes, A. J. J. Van den Berg, H. Van Dijk and R. P. Labadie, *Pharm. Pharmacol. Lett.*, 1997, **7**, 79–82.
58 S. Bijttebier, A. Van der Auwera, S. Voorspoels, B. Noten, N. Hermans, L. Pieters and S. Apers, *Planta Med.*, 2016, **82**, 559–72.
59 M. Wichtl, *Teedrogen und Phytopharmaka*, WVG Stuttgart, 1997.
60 P. Trouillas, C. Calliste, D. Allais, A. Simon, A. Marfak, C. Delage and J. Duroux, *Food Chem.*, 2003, **80**, 399–407.
61 I. V Shilova, E. A. Krasnov, E. I. Korotkova, M. G. Nagaev and A. N. Lukina, *Pharm. Chem. J.*, 2006, **40**, 660–662.
62 I. Papp, B. Simarandi, B. Blazics, A. Alberti, E. Hethelyi, S. Eva and A. Kery, *Chromatographia*, 2008, **68**, 125–129.
63 L. Barros, C. T. Alves, M. Dueñas, S. Silva, R. Oliveira, A. M. Carvalho, M. Henriques, C. Santos-Buelga and I. C. F. R. Ferreira, *Ind. Crops Prod.*, 2013, **44**, 104–110.
64 Y. Nitta, H. Kikuzaki, T. Azuma, Y. Ye, M. Sakaue, Y. Higuchi, H. Komori and H. Ueno, *Food Chem.*, 2013, **138**, 1551–1556.
65 I. Pawlaczyk, L. Czerchawski, W. Pilecki, E. Lamer-zarawska and R. Gancarz, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **77**, 568–575.
66 A. Toiu, L. Vlase and I. Oniga, 2011, **59**, 106–112.
67 N. Harbourne, E. Marete, J. C. Jacquier and D. O'Riordan, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2009, **42**, 1468–1473.

68 N. Harbourne, J. C. Jacquier and D. O'Riordan, *Food Chem.*, 2009, **116**, 722–727.
69 S. B. A. Halkes, C. J. Beukelman, B. H. Kroes, A. J. J. van den Berg, R. P. Labadie and H. van Dijk, *Phyther. Res.*, 1997, **11**, 518–520.
70 E. Neagu, G. Paun, C. Albu and G.-L. Radu, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.*, 2015, **52**, 1–6.
71 J. P. Piwowarski, A. K. Kiss and M. Kozłowska-Wojciechowska, *J. Ethnopharmacol.*, 2011, **137**, 937–941.
72 N. Corp and B. Pendry, *Perspect. Med.*, 2013.
73 A. Vasiliauskas, A. Keturkienė, L. Leonavièienė and D. Vaitkienė, *Acta Medica Litu.*, 2004, **11**, 31–36.
74 C. O. U. Moro and G. Basile, *Fitoterapia*, 2000, **71**, 73–82.
75 D. Životić and D. Životić, *Lekovito bilje u narodnoj medicini*, 'Otokar Keršovani - Rijeka', Beograd, IV., 1978.
76 S. Vogl, P. Picker, J. Mihaly-Bison, N. Fakhrudin, A. G. Atanasov, E. H. Heiss, C. Wawrosch, G. Reznicek, V. M. Dirsch, J. Saukel and B. Kopp, *J. Ethnopharmacol.*, 2013, **149**, 750–771.
77 E. A. Palombo and J. Wiley, 2006, **724**, 717–724.
78 D. Brown, *Encyclopedia of herbs & their uses*, The Royal Horticultural Society, London, 1996.
79 H. Tunon, C. Olavsdotter and L. Bohlin, *J. Ethnopharmacol.*, 1995, **48**, 61–76.
80 C. Abbet, R. Mayor, D. Roguet, R. Spichiger, M. Hamburger and O. Potterat, *J. Ethnopharmacol.*, 2013, **151**, 624–634.
81 I. Fecka, *Phytochem. Anal.*, 2009, **20**, 177–190.
82 I. Papp, P. Apati, V. Andrasek, A. Blazovics, A. Balazs, L. Kursinszki, G. C. Kite, P. J. Houghton and A. Kery, *Chromatographia*, 2004, **60**, 93–100.
83 E. Dadáková, N. Vrchotová and J. Tříska, *J. Agrobiol.*, 2010, **27**, 27–34.
84 V. Katalinic, M. Milos, T. Kulisic and M. Jukic, *Food Chem.*, 2006, **94**, 550–557.
85 D. Olennikov, N. Kashchenko and N. Chirikova, *Molecules*, 2017, **22**, 16.
86 V. A. Zhdanov, I. S. Sobolev, N. V. Baranovskaya, E. A. Kolesnikova, E. V. Cherenkaya and A. R. Yalaltdinova, *Earth Environ. Sci.*, 2016, 1–4.
87 M. Pukalskienė, P. R. Venskutonis and A. Pukalskas, *Rec. Nat. Prod.*, 2015, **9**, 451–455.
88 M. S. Giao, M. L. Gonzalez-Sanjose, M. D. Rivero-Perez, C. I. Pereira, M. E. Pintado and X. F. Malcata, *J. Sci. Food Agric.*, 2007, **2647**, 2638–2647.
89 C. Proestos, P. Zoumpoulakis and V. J. Sinanoglou, *Fpcusing Mod. Food Ind.*, 2013, **2**, 26–35.
90 M. P. Kahkonen, A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J.-P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala and M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 3954–3962.
91 O. Oktyabrsky, G. Vysochina, N. Muzyka, Z. Samoilova, T. Kukushkina and G. Smirnova, *J. Appl. Microbiol.*, 2009, **106**, 1175–1183.
92 I. V Shilova, T. V Zhavoronok, N. I. Suslov, E. A. Krasnov, T. P. Novozheeva, A. V Veremeev, M. G. Nagaev and G. V Petina, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2006, **142**, 216–218.
93 I. S. Boziaris, C. Proestos, M. Kapsokefalou and M. Komaitis, *Food Technol. Biotechnol.*, 2011, **49**, 263–270.
94 H. Turker, A. B. Yildirim and F. P. Karakaş, *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.*, 2009, **9**, 181–186.
95 J.-P. Rauha, S. Remes, M. Heinonen, A. Hopia, M. Kahkonen, T. Kujala, K. Pihlaja, H. Vuorela and P. Vuorela, *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **56**, 3–12.
96 S. Abachi, F. Khademi, H. Fatemi and F. Malekzadeh, *IOSR J. od Dent. Med. Sci.*, 2013, **5**, 55–59.

97 C. Cwikla, K. Schmidt, A. Matthias, K. M. Bone, R. Lehmann and E. Tiralongo, *Phyther. Res.*, 2010, **656**, 649–656.
98 P. Slanc, B. Doljak, S. Kreft, M. Lunder, D. Janeš and B. Štrukelj, *Phyther. Res.*, 2009, **877**, 874–877.
99 E. M. Drummond, N. Harbourne, E. Marete, D. Martyn, J. C. Jacquier, D. O'Riordan and E. R. Gibney, *Phyther. Res.*, 2013, **594**, 588–594.
100 E. M. Drummond, N. Harbourne, E. Marete, J. C. Jacquier, D. O'Riordan and E. R. Gibney, *J. Diet. Suppl.*, 2013, **10**, 370–380.
101 S. A. Ivanov, S. A. Garbuz, I. L. Malfanov and L. R. Ptitsyn, *Khimija Rastit. Syr'ja*, 2012, 165–172.
102 N. A. Spiridinov, D. A. Konovalov and V. V. Arkhipov, *Phytother.Res.*, 2005, **19**, 428–432.
103 M. S. Giao, M. L. Gonzalez-Sanjose, P. Muniz, M. D. Rivero-Perez, M. Kosinska, M. E. Pintado and F. X. Malcata, *J. Sci. Food Agric.*, 2008, **88**, 633–640.
104 A. I. Vengerovsky, N. I. Suslov and A. V Kaygorodsev, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2011, **151**, 421–424.
105 I. V Shilova, T. V Zhavoronok, N. I. Souslov, T. P. Novozheeva, R. N. Mustafin and A. M. Losseva, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2008, **146**, 49–51.
106 *Eur. Med. Agency*, 2011, 44, 1–18.
107 I. V Shilova, T. G. Khoruzhaya and I. A. Samylina, *Pharm. Chem. J.*, 2014, **47**, 552–555.
108 M. Gniewosz, A. Synowiec, K. Krasniewska, J. L. Przybyl, K. Baczek and Z. Weglarz, *Food Control*, 2014, **37**, 351–361.
109 D. Parojčić, *Arh. Farm. (Belgr).*, 2003, 51–70.
110 J. R. Vane and R. M. Botting, *Thromb. Res.*, 2003, **110**, 255–258.
111 L. Mišić and R. Lakušić, *Livadske biljke*, Svijetlost, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, Sarajevo, 1st edn., 1990.
112 E. Capecka, A. Geszprych, J. L. Przybyl, E. Kunicki, A. Binder, K. Baczek and Z. Weglarz, *Acta Sci. Pol.*, 2012, **11**, 101–109.
113 I. M. Imbrea, M. Butnariu, A. L. Nicolin and F. Imbrea, *J. Food, Agric. Environ.*, 2010, **8**, 111–116.
114 B. Šarić-Kundalić, C. Dobeš, V. Klatte-Asselmeyer and J. Saukel, *J. Ethnopharmacol.*, 2010, **131**, 33–55.
115 B. Šarić-Kundalić, C. Dobeš, V. Klatte-Asselmeyer and J. Saukel, *J. Ethnopharmacol.*, 2011, **133**, 1051–1076.
116 N. Radulović, M. Mišić, J. Aleksić, D. Đoković, R. Palić and G. Stojanović, *Fitoterapia*, 2007, **78**, 565–570.
117 Z. Popovic, M. Smiljanic, R. Matic, M. Kostic, P. Nikic and S. Bojovic, *Indian J. Tradit. Knowl.*, 2012, **11**, 385–400.
118 Z. Maksimović, S. Petrović, M. Pavlović, N. Kovačević and J. Kukić, *Fitoterapia*, 2007, **78**, 265–267.
119 M. Pukalskienė, P. R. Venskutonis and A. Pukalskas, *J. Funct. Foods*, 2015, **15**, 233–242.
120 T. Ćebović and Z. Maksimović, *Phyther. Res.*, 2012, **1091**, 1088–1091.
121 M. Pavlovic, S. Petrovic, M. Ristic, Z. Maksimovic and N. Kovacevic, *Chem. Nat. Compd.*, 2007, **43**, 228–229.
122 H. Smolarz, T. Dzido and A. Sokolowska-Wozniak, *Acta Pol. Pharm.*, 1999, **56**, 169–172.
123 J. Oszmianski, A. Wojdylo, E. Lamer-Zarawska and K. Swiader, *Food Chem.*, 2007, **100**, 579–583.

124 G. Smirnova, Z. Samoilova, N. Muzyka and O. Oktyabrsky, *J. Appl. Microbiol.*, 2012, **113**, 192–199.
125 V. V. Udut, A. I. Vengerovskii, N. I. Suslov, I. V. Shilova, A. V. Kaigorodtsev, N. Y. Polomeeva and A. M. Dygai, *Pharm. Chem. J.*, 2012, **46**, 492–494.
126 I. V. Shilova and N. I. Suslov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, **158**, 659–663.
127 I. V. Shilova, N. I. Suslov and V. P. Amelchenko, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, **159**, 376–379.
128 V. De Luca, V. Salim, D. Levac, S. M. Atsumi and F. Yu, *Methods Enzymol.*, 2012, **515**, 207–29.
129 J. T. Knudsen, L. Tollsten and L. G. Bergström, *Phytochemistry*, 1993, **33**, 253–280.
130 D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateos, J. P. E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges and A. Crozier, *Antioxid. Redox Signal.*, 2013, **18**, 1818–1892.
131 P. J. Facchini, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2001, **52**, 29–66.
132 G. R. Velderrain-Rodríguez, H. Palafox-Carlos, A. Wall-Medrano, J. F. Ayala-Zavala, C.-Y. O. Chen, M. Robles-Sánchez, H. Astiazaran-García, E. Alvarez-Parrilla and G. A. González-Aguilar, *Food Funct.*, 2014, **5**, 189–197.
133 W. Vermerris and R. Nicholson, *Phenolic Compounds Biochemistry*, Springer, Dordrecht, The Netherlands, 2006.
134 P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*, John Wiley & Sons Ltd, Southern Gate, Chichester, United Kingdom, 3rd edn., 2009.
135 C. G. Fraga, M. Galleano, S. V. Verstraeten and P. I. Oteiza, *Mol. Aspects Med.*, 2010, **31**, 435–445.
136 H. Wagner and S. Bladt, *Pland Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2nd edn., 1996.
137 T. Okuda, T. Yoshida, T. Hatano, M. Iwasaki, M. Kubo, T. Orime, M. Yoshizaki and N. Naruhashi, *Phytochemistry*, 1992, **31**, 3091–3096.
138 V. Koleckar, K. Kubikova, Z. Rehakova, K. Kuca, D. Jun, L. Jahodar and L. Opletal, *Mini-Reviews Med. Chem.*, 2008, **8**, 436–447.
139 B. Zhang, X. L. He, Y. Ding and G. H. Du, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, **530**, 166–171.
140 D. M. Ribnicky, A. Poulev and I. Raskin, *J. Nutraceuticals, Funct. Med. Foods*, 2003, **4**, 39–52.
141 L. H. Yao, Y. M. Jiang, J. Shi, F. A. Tomas-Barberan, N. Datta, R. Singanusong and S. S. Chen, *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2004, **59**, 113–122.
142 D. Procházková, I. Boušová and N. Wilhelmová, *Fitoterapia*, 2011, **82**, 513–23.
143 T. P. T. Cushnie and A. J. Lamb, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2005, **26**, 343–356.
144 R. Sharma, *Polyphenols in Health and Disease*, Elsevier, 2014.
145 C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004, **79**, 727–747.
146 H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2010, **501**, 2–5.
147 D. Del Rio, L. G. Costa, M. E. J. Lean and A. Crozier, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 2010, **20**, 1–6.
148 P. Mena, L. Calani, R. Bruni and D. Daniele Del Rio, in *Diet-Microbe interactions in the gut: Effects on human health and disease*, Elsevier Inc., 2014, pp. 73–101.
149 V. Saibabu, Z. Fatima, L. A. Khan and S. Hameed, *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2015, **2015**, 10.
150 S. A. Heleno, A. Martins, M. J. R. P. Queiroz and I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem.*, 2015, **173**, 501–513.
151 C. J. Dillard and J. Bruce German, *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **80**, 1744–1756.
152 D. Vauzour, A. Rodriguez-Mateos, G. Corona, M. J. Oruna-Concha and J. P. E. Spencer, *Nutrients*, 2010, **2**, 1106–1131.

153 M. L. Urso and P. M. Clarkson, *Toxicology*, 2003, **189**, 41–54.
154 G. Noctor, C. Lelarge-Trouverie and A. Mhamdi, *Phytochemistry*, 2015, **112**, 33–53.
155 P. Rajendran, N. Nandakumar, T. Rengarajan, R. Palaniswami, E. N. Gnanadhas, U. Lakshminarasaiah, J. Gopas and I. Nishigaki, *Clin. Chim. Acta*, 2014, **436**, 332–347.
156 A. Höhn, D. Weber, T. Jung, C. Ott, M. Hugo, B. Kochlik, R. Kehm, J. König, T. Grune and J. P. Castro, *Redox Biol.*, 2017, **11**, 482–501.
157 F. Shahidi and P. Ambigaipalan, *J. Funct. Foods*, 2015, **18**, 820–897.
158 R. J. Nijveldt, E. van Nood, D. E. C. van Horn, P. G. Boelens, K. van Norren and P. A. M. van Leeuwen, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, **74**, 418–425.
159 A. García-Lafuente, E. Guillamón, A. Villares, M. A. Rostagno and J. A. Martínez, *Inflamm. Res.*, 2009, **58**, 537–552.
160 M.-H. Pan, C.-S. Lai and C.-T. Ho, *Food Funct.*, 2010, **1**, 15–31.
161 M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **51**, 15–25.
162 M. Gomberg, *J. Am. Chem. Soc.*, 1900, **22**, 757–771.
163 V. I. Lushchak, *Chem. Biol. Interact.*, 2014, **224**, 164–175.
164 B. Halliwell, *Am. J. Med.*, 1991, **91**, S14–S22.
165 B. Halliwell, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2011, **32**, 125–130.
166 M. M. Đukić, *Oksidativni stres - slobodni radikali, prooksidansi i antioksidansi*, Mono i Manjana, Beograd, 2008.
167 M. C. H. Gruhlke and A. J. Slusarenko, 2012.
168 A. A. Hamid, O. O. Aiyelaagbe, L. A. Usman, O. M. Ameen and A. Lawal, *African J. Pure Appl. Chem.*, 2010, **4**, 142–151.
169 B. Halliwell, *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, **46**, 531–542.
170 S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi and B. B. Aggarwal, *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, **49**, 1603–1616.
171 S. Saeidnia and M. Abdollahi, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2013, **273**, 442–55.
172 A. Rahal, A. Kumar, V. Singh, B. Yadav, R. Tiwari, S. Chakraborty and K. Dhama, *Biomed Res. Int.*, 2014, **2014**, 19.
173 B. Halliwell, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, **476**, 107–112.
174 F. Shahidi and Y. Zhong, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, ed. F. Shahidi, 6th edn., 2005, pp. 491–512.
175 M. Leopoldini, N. Russo and M. Toscano, *Food Chem.*, 2011, **125**, 288–306.
176 D. Amić, D. Davidović-Amić, D. Beslo, V. Rastija, B. Lucić and N. Trinajstić, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 827–845.
177 S. Saeidnia and M. Abdollahi, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2013, **271**, 49–63.
178 B. Halliwell, *Lancet*, 2000, **355**, 1179–1180.
179 B. J. Day, *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, **66**, 58–64.
180 A. Upadhyay, I. Upadhyaya, A. Kollanoor-Johny and K. Venkitanarayanan, *Biomed Res. Int.*, 2014, **2014**.
181 M. A. Ansari, A. Anurag, Z. Fatima and S. Hameed, in *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, ed. A. Méndez-Vilas, Formatex, 2013, pp. 1189–1195.
182 R. González-Lamothe, G. Mitchell, M. Gattuso, M. S. Diarra, F. Malouin and K. Bouarab, *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, **10**, 3400–19.
183 M. M. Tajkarimi, S. A. Ibrahim and D. O. Cliver, *Food Control*, 2010, **21**, 1199–1218.
184 S. P. Denyer, *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 1995, **36**, 227–245.
185 M. Cowan, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, **12**, 564–82.
186 G. J. Tortora, B. R. Funke and C. L. Case, *Microbiology - An Introduction*, Pearson Australia, 11th edn., 2013.
187 J. K. Patra and Y. K. Mohanta, *Chin. J. Integr. Med.*, 2014, **20**, 311–320.

188 R. Gyawali and S. A. Ibrahim, *Food Control*, 2014, **46**, 412–429.
189 N. S. Radulović, P. D. Blagojević, Z. Z. Stojanović-Radić and N. M. Stojanović, *Curr. Med. Chem.*, 2013, **20**, 932–52.
190 O. Takeuchi and S. Akira, *Cell*, 2010, **140**, 805–20.
191 J. B. Calixto, M. F. Otuki and R. S. Santos, Adair, *Planta Med.*, 2003, **69**, 973–983.
192 E. Ricciotti and G. A. FitzGerald, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2011, **72**, 181–204.
193 J. Ritter, R. Flower, G. Henderson and H. Rang, *Rang & Dale's Pharmacology*, Elsevier Inc., 2015.
194 R. A. Scherrer and M. W. Whitehouse, *Antiinfammatory Agents - Chemistry and Pharmacology*, Academic Press, New York, 1974.
195 P. J. Koelink, S. A. Overbeek, S. Braber, P. de Kruijf, G. Folkerts, M. J. Smit and A. D. Kraneveld, *Pharmacol. Ther.*, 2012, **133**, 1–18.
196 R. Fürst and I. Zündorf, *Mediators Inflamm.*, 2014, **2014**, 9.
197 C. Smith, A. D. Marks and M. Lieberman, *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, Lippincott, williams & Wilkins, Philadelphia, 2nd edn., 2005.
198 A. L. Lehninger, D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 2005.
199 D. L. Garrett and C. M. Grisham, *Biochemistry*, Saunders, London, 2nd edn., 1999.
200 R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes and V. W. Rodwell, *Harper's Illustrated Biochemistry*, Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publishing Division, New York, 26th edn., 2003.
201 C. E. Dugowson and P. Gnanashanmugam, *Phys. Med. Rehabil. Clin. North Am.*, 2006, **17**, 347–354.
202 H. E. Vonkeman and M. A. F. J. van de Laar, *Semin. Arthritis Rheum.*, 2010, **39**, 294–312.
203 P. N. P. Rao, E. E. Knaus, T. P. Road and L. Jolla, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2008, **11**, 81–110.
204 P. Thiagarajan and J. A. Jankowski, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2012, **26**, 197–206.
205 C. Hawkey, *Lancet*, 1999, **353**, 307–314.
206 J. R. Vane, Y. S. Bakhle and R. M. Botting, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1998, **38**, 97–120.
207 J. R. Vane and R. M. Botting, *Inflamm. Res.*, 1998, **47**, 78–87.
208 Q. Wang, H. Kuang, Y. Su, Y. Sun, J. Feng, R. Guo and K. Chan, *J. Ethnopharmacol.*, 2013, **146**, 9–39.
209 Y. Bellik, L. Boukraâ, H. A. Alzahrani, B. A. Bakhotmah, F. Abdellah, S. M. Hammoudi and M. Iguer-Ouada, *Molecules*, 2012, **18**, 322–353.
210 P. Rathee, H. Chaudhary, S. Rathee, D. Rathee, V. Kumar and K. Kohli, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 2009, **8**, 229–235.
211 L. P. Gartner and J. L. Hiatt, *Color Atlas and Text of Histology*, Wolters kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 6th edn., 2014.
212 A. L. Mescher, *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas*, Mcgraw-hill, 12th edn., 2009.
213 M. H. Ross and W. Pawlina, *Histology A text and Atlas*, Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 6th edn., 2011.
214 A. C. Guyton and J. E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Inc., Philadelphia, USA, 11th edn., 2006.
215 K. Barrett, H. Brooks, S. Boitano and B. S, *Ganong's Review of Medical Physiology*, McGraw-Hill, 23rd edn., 2010.

216 M. A. Ferguson, V. S. Vaidya and J. V. Bonventre, *Toxicology*, 2008, **245**, 182–193.
217 H. S. Abou Seif, *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.*, 2016, **5**, 134–146.
218 G. Ostapowicz, R. J. Fontana, F. V. Schiødt, A. Larson, T. J. Davern, S. H. B. Han, T. M. McCashland, A. O. Shakil, J. E. Hay, L. Hynan, J. S. Crippin, A. T. Blei, G. Samuel, J. Reisch and W. M. Lee, *Ann. Intern. Med.*, 2002, **137**, 947.
219 M. Maes, M. Vinken and H. Jaeschke, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2016, **290**, 86–97.
220 H. Jaeschke, G. J. Gores, A. I. Cederbaum, J. A. Hinson, D. Pessayre and J. J. Lemasters, *Toxicol. Sci.*, 2002, **65**, 166–176.
221 V. Mihailović, M. Mihailović, A. Uskoković, J. Arambašić, D. Mišić, V. Stanković, J. Katanić, M. Mladenović, S. Solujić and S. Matić, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **52**, 83–90.
222 E. Ozbek, *Int. J. Nephrol.*, 2012, 2012, 1–9.
223 D. H. Humes and J. M. Weinberg, *Disease-a-Month*, 2008, **28**, 7–81.
224 B. George, D. You, M. S. Joy and L. M. Aleksunes, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017.
225 S. Dasari and P. Bernard Tchounwou, *Eur. J. Pharmacol.*, 2014, **740**, 364–378.
226 World Health Organization, *'Comparative Table of Medicines on the WHO Essential Medicines Lists from 1977–2011' (XLS)*, Retrieved., 2011.
227 Y. I. Chirino and J. Pedraza-Chaverri, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2009, **61**, 223–242.
228 S. Gómez-Ruiz, D. Maksimović-Ivanić, S. Mijatović and G. N. Kaluderović, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2012, **2012**, 15–17.
229 M. Crul, J. H. Schellens, J. H. Beijnen and M. Maliepaard, *Cancer Treat. Rev.*, 1997, **23**, 341–66.
230 Ž. D. Bugarčić, J. Bogojeski, B. Petrović, S. Hochreuther and R. van Eldik, *Dalt. Trans.*, 2012, **41**, 12329–12345.
231 L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer*, 2007, **7**, 573–84.
232 E. R. Jamieson and S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2467–2498.
233 V. Longo, P. G. Gervasi and V. Lubrano, *Food Chem. Toxicol.*, 2011, **49**, 233–237.
234 C. A. Rabik and M. E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.*, 2007, **33**, 9–23.
235 J. Jin, M. Li, Z. Zhao, X. Sun, J. Li, W. Wang, M. Huang and Z. Huang, *Phytomedicine*, 2015, **22**, 528–535.
236 V. Mihailović, J. Katanić, D. Mišić, V. Stanković, M. Mihailović, A. Uskoković, J. Arambašić, S. Solujić, M. Mladenović and N. Stanković, *Food Funct.*, 2014, **5**, 1795–803.
237 A. Nersesyan and R. Muradyan, *Exp. Oncol.*, 2004, **26**, 153–155.
238 H. P. Misra and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 3170–3175.
239 T. Karasawa and P. S. Steyger, *Toxicol. Lett.*, 2015, **237**, 219–227.
240 N. Pabla and Z. Dong, *Kidney Int.*, 2008, **73**, 994–1007.
241 C. W. Fong, *Free Radic. Biol. Med.*, 2016, **95**, 216–229.
242 C. Gerhauser, *Top. Curr. Chem.*, 2013, **329**, 73–132.
243 K. Sak, *Chemother. Res. Pract.*, 2012, **2012**, 282570.
244 A. E. Quirós-Sauceda, H. Palafox-Carlos, S. G. Sáyago-Ayerdi, J. F. Ayala-Zavala, L. A. Bello-Perez, E. Álvarez-Parrilla, L. A. de la Rosa, A. F. González-Córdova and G. A. González-Aguilar, *Food Funct.*, 2014, **5**, 1063.
245 S. Ojha, B. Venkataraman, A. Kurdi, E. Mahgoub, B. Sadek and M. Rajesh, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, 2016, 1–27.
246 T. A. Ajith, V. Nivitha and S. Usha, *Food Chem. Toxicol.*, 2007, **45**, 921–927.
247 P. Chatterjee, A. Mukherjee and S. Nandy, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2012, **2**, S1754–S1763.
248 M. I. Yousef, A. A. Saad and L. K. El-Shennawy, *Food Chem. Toxicol.*, 2009, **47**, 1176–1183.

249 R. Domitrović, I. Potočnjak, Ž. Crnčević-Orlić and M. Škoda, *Food Chem. Toxicol.*, 2014, **66**, 321–328.
250 W. Arjumand, A. Seth and S. Sultana, *Food Chem. Toxicol.*, 2011, **49**, 2013–2021.
251 M. Waseem and S. Parvez, *Food Chem. Toxicol.*, 2013, **53**, 334–342.
252 L. Kristanc and S. Kreft, *Food Chem. Toxicol.*, 2016, 92, 38–49.
253 R. Domitrović and I. Potočnjak, *Arch. Toxicol.*, 2016, **90**, 39–79.
254 A. Hermenean, C. Smeu, S. Gharbia, I. A. Krizbai and A. Ardelean, *Curr. Pharm. Des.*, 2016, **22**, 5415–5441.
255 Council of Europe, *European Pharmacopoeia 7.0*, 2010.
256 V. L. Singleton, R. Orthofer and R. M. Lamuela-Raventós, *Methods Enzymol.*, 1999, **299**, 152–178.
257 I. M. C. Brighente, M. Dias, L. G. Verdi and M. G. Pizzolatti, *Pharm. Biol.*, 2007, **45**, 156–161.
258 A. I. Yermakov, V. V. Arasimov and N. P. Yarosh, *Methods of Biochemical Analysis of Plants*, Agropromizdat, Leningrad, 1987.
259 A. Matkowski, S. Zielińska, J. Oszmiański and E. Lamer-Zarawska, *Bioresour. Technol.*, 2008, **99**, 7892–6.
260 A. Scalbert, B. Monties and G. Janin, *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **35**, 1324–1329.
261 E. Haslam, *Phytochemistry*, 1965, **4**, 495–498.
262 M. Mónica Giusti and R. E. Wrolstad, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2001.
263 *World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy: 2014–2023*, World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2013.
264 J. Koolman and K. H. Roehm, *Color Atlas of Biochemistry*, Thieme, Stuttgart, New York, 2nd edn., 2005.
265 A. M. Engida, N. S. Kasim, Y. A. Tsigie, S. Ismadji, L. H. Huynh and Y.-H. Ju, *Ind. Crops Prod.*, 2013, **41**, 392–396.
266 P. Prieto, M. Pineda and M. Aguilar, *Anal. Biochem.*, 1999, **269**, 337–341.
267 Y. Kumarasamy, M. Byres, P. J. Cox, M. Jaspars, L. Nahar and S. D. Sarker, *Phyther. Res.*, 2007, **21**, 615–621.
268 R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231–1237.
269 E. Kunchandy and M. N. A. Rao, *Int. J. Pharm.*, 1990, **58**, 237–240.
270 L. C. Green, D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum, *Anal. Biochem.*, 1982, **126**, 131–138.
271 D. Tsikas, *J. Chromatogr. B*, 2007, **851**, 51–70.
272 M. Oyaizu, *Japanese J. Nutr.*, 1986, **44**, 307–314.
273 L. Yan, L. Teng and T. Jhi, *Sunw. Acad. J.*, 2006, **3**, 9–20.
274 D. Gupta, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2015, **6**, 546–566.
275 M. Laguerre, J. Lecomte and P. Villeneuve, *Prog. Lipid Res.*, 2007, **46**, 244–282.
276 C.-K. Hsu, B.-H. Chiang, Y.-S. Chen, J.-H. Yang and C.-L. Liu, *Food Chem.*, 2008, **108**, 633–641.
277 N. Wu, Y. Zu, Y. Fu, Y. Kong, J. Zhao, X. Li, J. Li, M. Wink and T. Efferth, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 4737–4743.
278 A. B. Falowo, P. O. Fayemi and V. Muchenje, *Food Res. Int.*, 2014, **64**, 171–181.
279 M. Wettasinghe and F. Shahidi, *Food Chem.*, 1999, **67**, 399–414.
280 G. M. Siu and H. H. Draper, *J. Food Sci.*, 1978, **43**, 1147–1149.
281 P. Kittiphattanabawon, S. Benjakul, W. Visessanguan and F. Shahidi, *Food Chem.*, 2012, **135**, 1118–1126.
282 M. S. Giao, S. Gomes, A. R. Madureira, A. Faria, D. Pestana, C. Calhau, M. E.

Pintado, I. Azevedo and F. X. Malcata, *Food Chem.*, 2012, **131**, 761–767.
283 L. Siracusa, T. Kulisic-Bilusic, O. Politeo, I. Krause, B. Dejanovic and G. Ruberto, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 12453–12459.
284 H. Enari, Y. Takahashi, M. Kawarasaki, M. Tada and K. Tatsuta, *Fish. Sci.*, 2008, **74**, 911–920.
285 S. D. Sarker, L. Nahar and Y. Kumarasamy, *Methods*, 2007, **42**, 321–324.
286 B. Rinner, N. Kretschmer, H. Knausz, A. Mayer, H. Boechzelt, X.-J. Hao, G. Heubl, T. Efferth, H. Schaider and R. Bauer, *J. Ethnopharmacol.*, 2010, **129**, 182–8.
287 S. Galasso, S. Pacifico, N. Kretschmer, S.-P. Pan, S. Marciano, S. Piccolella, P. Monaco and R. Bauer, *Phytochemistry*, 2014, **107**, 80–90.
288 D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff and M. R. Boyd, *Cancer Res.*, 1988, **48**, 4827–4833.
289 B. L. Fiebich, M. Grozdeva, S. Hess, M. Hüll, U. Danesch, A. Bodensieck and R. Bauer, *Planta Med.*, 2005, **71**, 12–19.
290 E. A. Reininger and R. Bauer, *Phytomedicine*, 2006, **13**, 164–9.
291 J. W. Lim, H. Kim and K. H. Kim, *Lab. Invest.*, 2001, **81**, 349–60.
292 S. Pacifico, S. Galasso, S. Piccolella, N. Kretschmer, S. P. Pan, S. Marciano, R. Bauer and P. Monaco, *Food Res. Int.*, 2015, **69**, 121–132.
293 S. Takashiba, T. E. Van Dyke, S. Amar, Y. Murayama, A. W. Soskolne and L. Shapira, *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 5573–5578.
294 B. Cikota, A. Janežić and Z. Magić, *Vojnosanit. Pregl.*, 2002, **59**, 551–556.
295 K. J. Livak and T. D. Schmittgen, *Methods*, 2001, **25**, 402–408.
296 R. Murugan and T. Parimelazhagan, *Ind. Crops Prod.*, 2013, **51**, 360–369.
297 K. F. Swingle, *Chapter 2 - Evaluation for Antiinflammatory Activity*, Academic Press, Inc., 1974.
298 A. S. Melo, M. C. Monteiro, J. B. da Silva, F. R. de Oliveira, J. L. F. Vieira, M. A. de Andrade, A. C. Baetas, J. T. Sakai, F. A. Ferreira, P. J. da Cunha Sousa and C. do S. F. Maia, *J. Ethnopharmacol.*, 2013, **147**, 293–301.
299 A. S. Rabelo, I. D. Oliveira, A. G. Guimaraes, J. S. S. Quintans, A. P. N. Prata, D. P. Gelain, E. M. Venceslau, J. P. A. Santos, L. J. Quintans-Junior, L. R. Bonjardim, A. Barison, F. R. Campos, A. D. C. Santos, P. C. L. Nogueira, E. V. Costa, V. R. S. Moraes and A. A. S. Araujo, *J. Ethnopharmacol.*, 2013, **145**, 11–17.
300 A. W. Bannon and A. B. Malmberg, *Curr. Protoc. Neurosci.*, 2007, **Chapter 8**, Unit 8.9.
301 D. Huang, Y. Chen, W. Chen, Y. Liu, F. Yao, D. Xue and L. Sun, *J. Ethnopharmacol.*, 2015, **176**, 356–364.
302 C. J. Morris, in *Methods in Molecular Biology, vol. 225: Inflammation Protocols*, eds. P. G. Winyard and D. A. Willoughby, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2003, pp. 115–121.
303 B. Dhar Sahu, M. Kuncha, G. Jeevana Sindhura and R. Sistla, *Eur. J. Integr. Med.*, 2013, **20**, 453–460.
304 B. D. Sahu, K. K. R. Rentam, U. K. Putcha, M. Kuncha, G. M. N. Vegi and R. Sistla, *Food Chem. Toxicol.*, 2011, **49**, 3090–3097.
305 O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. Lewis Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265–275.
306 M. D. Rosenthal and R. H. Glew, *Medical Biochemistry - Human Metabolism in Health and Disease*, John Wiley & Sons, Inc., 2nd edn., 2009.
307 L. Goth, *Clin. Chim. Acta.*, 1991, **196**, 143–151.
308 G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, **82**, 70–77.
309 H. Ohkawa, N. Ohishi and K. Yagi, *Anal. Biochem.*, 1979, **95**, 351–358.

310 N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider, *Exp. Cell Res.*, 1988, **175**, 184–191.
311 A. R. Collins, *Mol. Biotechnol.*, **26**, 249.
312 K. Manoharan and M. R. Banerjee, *Cell Biol. Int. Rep.*, 1985, **9**, 783–789.
313 A. L. Piccinelli, I. Pagano, T. Esposito, T. Mencherini, A. Porta, A. M. Petrone, P. Gazzerro, P. Picerno, F. Sansone, L. Rastrelli and R. P. Aquino, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 585–595.
314 L. M. de Souza, T. R. Cipriani, M. Iacomini, P. A. J. Gorin and G. L. Sassaki, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2008, **47**, 59–67.
315 M. I. Dias, L. Barros, M. B. P. P. Oliveira, C. Santos-Buelga and I. C. F. R. Ferreira, *Ind. Crops Prod.*, 2015, **63**, 125–132.
316 R. García-Villalba, J. C. Espín, K. Aaby, C. Alasalvar, M. Heinonen, G. Jacobs, S. Voorspoels, T. Koivumäki, P. A. Kroon, E. Pelvan, S. Saha and F. A. Tomás-Barberán, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, **63**, 6555–6566.
317 J. Moilanen, P. Koskinen and J. P. Salminen, *Phytochemistry*, 2015, **116**, 188–197.
318 M. A. Álvarez-Fernández, A. B. Cerezo, A. M. Cañete-Rodríguez, A. M. Troncoso and M. C. García-Parrilla, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, **63**, 2041–2051.
319 L. O. Ojwang, L. Yang, L. Dykes and J. Awika, *Food Chem.*, 2013, **139**, 35–43.
320 U. Kuczkowiak, F. Petereit and A. Nahrstedt, *Sci. Pharm.*, 2014, **82**, 835–46.
321 R. Hahn and A. Nahrstedt, *Planta Med.*, 1993, **59**, 71–75.
322 P. Lorenz, S. Duckstein, J. Conrad, M. Knödler, U. Meyer and F. C. Stintzing, *Chem. Biodivers.*, 2012, **9**, 282–297.
323 M. A. Álvarez-Fernández, R. Hornedo-Ortega, A. B. Cerezo, A. M. Troncoso and M. C. García-Parrilla, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 1367–1376.
324 E. Niki, *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, **49**, 503–15.
325 V. Mihailović, S. Matić, D. Mišić, S. Solujić, S. Stanić, J. Katanić, M. Mladenović and N. Stanković, *EXCLI J.*, 2013, **12**, 807–823.
326 F. Amano and T. Noda, *FEBS Lett.*, 1995, **368**, 425–428.
327 J. Pokorny, N. Yanishlieva and M. Gordon, *Antioxidants in food: Practical applications*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, 1st edn., 2001.
328 C. Mariem, M. Sameh, S. Nadhem, Z. Soumaya, Z. Najiba and E. G. Raoudha, *Ind. Crops Prod.*, 2014, **55**, 295–303.
329 S. Gonçalves, D. Gomes, P. Costa and A. Romano, *Ind. Crops Prod.*, 2013, **43**, 465–471.
330 R. Nasri, I. Younes, M. Jridi, M. Trigui, A. Bougatef, N. Nedjar-Arroume, P. Dhulster, M. Nasri and M. Karra-Châabouni, *Food Res. Int.*, 2013, **54**, 552–561.
331 M. H. Im, Y.-S. Park, H. Leontowicz, M. Leontowicz, J. Namiesnik, K.-S. Ham, S.-G. Kang, K. Najman and S. Gorinstein, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 92–99.
332 S. H. Häkkinen, S. O. Kärenlampi, I. M. Heinonen, H. M. Mykkänen and A. R. Törrönen, *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **77**, 543–551.
333 S. Samardžić, M. Tomić, U. Pecikoza, R. Stepanović-Petrović and Z. Maksimović, *J. Ethnopharmacol.*, 2016, **193**, 652–656.
334 L. Lluís, M. Muñoz, M. Rosa Nogués, V. Sánchez-Martos, M. Romeu, M. Giralt, J. Valls and R. Solà, *Food Chem. Toxicol.*, 2011, **49**, 1450–1454.
335 I. Spranger, B. Sun, A. M. Mateus, V. de Freitas and J. M. Ricardo-da-Silva, *Food Chem.*, 2008, **108**, 519–532.
336 A. A. Zanwar, S. L. Badole, P. S. Shende, M. V. Hegde and S. L. Bodhankar, *Antioxidant Role of Catechin in Health and Disease*, Elsevier Inc., 2013, vol. 1.
337 B. A. Sutherland, R. M. A. Rahman and I. Appleton, *J. Nutr. Biochem.*, 2006, **17**, 291–306.

338 B. Blazics, I. Papp and Á. Kéry, *Chromatographia*, 2010, **71**, 61–67.
339 Y. Ruiz-Navajas, M. Viuda-Martos, E. Sendra, J. A. Perez-Alvarez and J. Fernández-López, *Food Control*, 2013, **30**, 386–392.
340 E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito and N. Noguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **338**, 668–676.
341 A. Moure, J. M. Cruz, D. Franco, J. M. Domínguez, J. Sineiro, H. Domínguez, M. José Núñez and J. C. Parajó, *Food Chem.*, 2001, **72**, 145–171.
342 S.-J. Kim, A. R. Cho and J. Han, *Food Control*, 2013, **29**, 112–120.
343 J. Jiang and Y. L. Xiong, *Meat Sci.*, 2016, **120**, 107–117.
344 D. Huang, B. Ou and R. L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 1841–1856.
345 A. Aguirre and R. Borneo, in *Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease*, Elsevier, 1st edn., 2013, pp. 527–535.
346 M. Friedman and H. S. Jürgens, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 2101–2110.
347 N. Harbourne, E. Marete, J. C. Jacquier and D. O'Riordan, *Food Res. Int.*, 2013, **50**, 480–486.
348 G.-L. Chen, S.-G. Chen, Y.-Y. Zhao, C.-X. Luo, J. Li and Y.-Q. Gao, *Ind. Crops Prod.*, 2014, **57**, 150–157.
349 M. J. Bermúdez-Soto, F. A. Tomás-Barberán and M. T. García-Conesa, *Food Chem.*, 2007, **102**, 865–874.
350 D. Tagliazucchi, E. Verzelloni, D. Bertolini and A. Conte, *Food Chem.*, 2010, **120**, 599–606.
351 N. Silva and A. Fernandes Júnior, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, 2010, **16**, 402–413.
352 M. Daglia, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, **23**, 174–181.
353 D. D. Orhan, B. Özçelik, S. Özgen and F. Ergun, *Microbiol. Res.*, 2010, **165**, 496–504.
354 K. A. Ohemeng, C. F. Schwender, K. P. Fu and J. F. Barrett, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, **3**, 225–230.
355 A. Plaper, M. Golob, I. Hafner, M. Oblak, T. Šolmajer and R. Jerala, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, **306**, 530–536.
356 T. P. T. Cushnie and A. J. Lamb, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2011, 38, 99–107.
357 M. J. Saavedra, A. Borges, C. Dias, A. Aires, R. N. Bennett, E. S. Rosa and M. Simões, *Med. Chem.*, 2010, **6**, 174–83.
358 R. Vinegar, W. Schreiber and R. Hugo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1969, **166**, 96–103.
359 A. P. Rogerio, A. Kanashiro, C. Fontanari, E. V. G. da Silva, Y. M. Lucisano-Valim, E. G. Soares and L. H. Faccioli, *Inflamm. Res.*, 2007, **56**, 402–8.
360 L. Wang, B. Wang, H. Li, H. Lu, F. Qiu, L. Xiong, Y. Xu, G. Wang, X. Liu, H. Wu and H. Jing, *Eur. J. Pharmacol.*, 2012, **690**, 133–41.
361 A. W. Boots, L. C. Wilms, E. L. R. Swennen, J. C. S. Kleinjans, A. Bast and G. R. M. M. Haenen, *Nutrition*, 2008, **24**, 703–10.
362 T. Nakanishi, K. Mukai, H. Yumoto, K. Hirao, Y. Hosokawa and T. Matsuo, *Eur. J. Oral Sci.*, 2010, **118**, 145–50.
363 D.-J. Yang, S.-C. Liu, Y.-C. Chen, S.-H. Hsu, Y.-P. Chang and J.-T. Lin, *J. Food Biochem.*, 2015, **39**, 334–343.
364 C. Wang, T.-T. Zhang, G.-H. Du and D.-M. Zhang, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2011, **13**, 817–825.
365 B. Zhang, J.-B. Li, D.-M. Zhang, Y. Ding and G.-H. Du, *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**, 465–469.
366 O. A. Badary, S. Abdel-maksoud, W. A. Ahmed and G. H. Owieda, 2005, **76**, 2125–2135.
367 S. İşeri, F. Ercan, N. Gedik, M. Yüksel and İ. Alican, *Toxicology*, 2007, **230**, 256–264.

368 P. Bragado, A. Armesilla, A. Silva and A. Porras, *Apoptosis*, 2007, **12**, 1733–1742.
369 M. A. Jakupec, M. Galanski and B. K. Keppler, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2003, **146**, 1–53.
370 C. Tsitsimpikou, M. Tzatzarakis, P. Fragkiadaki, L. Kovatsi, P. Stivaktakis, A. Kalogeraki, D. Kouretas and A. M. Tsatsakis, *Toxicology*, 2013, **307**, 109–114.
371 S. Sinha, M. Jothiramajayam, M. Ghosh, A. Jana, U. Chatterji and A. Mukherjee, *Food Chem. Toxicol.*, 2015, **81**, 120–128.
372 A. Tilyek, C. Chai, X. Hou, B. Zhou, C. Zhang, Z. Cao and B. Yu, *J. Ethnopharmacol.*, 2016, **178**, 297–306.
373 N. Yamabe, J. Y. Park, S. Lee, E.-J. Cho, S. Lee, K. S. Kang, G. S. Hwang, S.-N. Kim, H. Y. Kim and T. Shibamoto, *J. Funct. Foods*, 2015, **19**, 20–27.
374 M. I. Yousef and H. M. Hussien, *Food Chem. Toxicol.*, 2015, **78**, 17–25.
375 O. A. Almaghrabi, *Saudi J. Biol. Sci.*, 2015, **22**, 227–231.
376 I. Hassan, S. Chibber and I. Naseem, *Food Chem. Toxicol.*, 2010, **48**, 2052–2058.
377 P. Mistry, C. Lee and D. C. H. McBrien, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1989, **24**, 73–79.
378 E. Niki, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2014, **1840**, 809–817.
379 A. I. Vardavas, P. D. Stivaktakis, M. N. Tzatzarakis, P. Fragkiadaki, F. Vasilaki, M. Tzardi, G. Datseri, J. Tsiaoussis, A. K. Alegakis, C. Tsitsimpikou, V. N. Rakitskii, F. Carvalho and A. M. Tsatsakis, *Food Chem. Toxicol.*, 2016, **94**, 250–259.
380 C. Tsitsimpikou, F. Vasilaki, K. Tsarouhas, P. Fragkiadaki, M. Tzardi, N. Goutzourelas, C. Nepka, A. Kalogeraki, I. Heretis, Z. Epitropaki, D. Kouretas and A. M. Tsatsakis, *Toxicol. Lett.*, 2016, **259**, 21–27.
381 H. R. Yilmaz, M. Iraz, S. Sogut, H. Ozyurt, Z. Yildirim, O. Akyol and S. Gergerlioglu, *Pharmacol. Res.*, 2004, **50**, 287–290.
382 J. H. Lee, H. J. Lee, H. J. Lee, W. C. Choi, S. W. Yoon, S. G. Ko, K. S. Ahn, S. H. Choi, K. S. Ahn, J. C. Lieske and S. H. Kim, *Phytomedicine*, 2009, **16**, 188–197.
383 B. Fernandez-Rojas, O. N. Medina-Campos, R. Hernandez-Pando, M. Negrette-Guzman, S. Huerta-Yepez and J. Pedraza-Chaverri, *Food Funct.*, 2014, **5**, 480–490.
384 C. G. Fraga and P. I. Oteiza, *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, **51**, 813–823.
385 J. P. Spencer, H. Schroeter, G. Kuhnle, S. K. Srai, R. M. Tyrrell, U. Hahn and C. Rice-Evans, *Biochem. J.*, 2001, **354**, 493–500.
386 M. Kähkönen, P. Kylli, V. Ollilainen, J. P. Salminen and M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 1167–1174.
387 S. Liu, W. Hou, P. Yao, B. Zhang, S. Sun, A. K. Nüssler and L. Liu, *Toxicol. Vitr.*, 2010, **24**, 516–522.
388 P. D. Sanchez-Gonzalez, F. J. Lopez-Hernandez, F. Perez-Barriocanal, A. I. Morales and J. M. Lopez-Novoa, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2011, **26**, 3484–3495.
389 Y.-M. Ham, W.-J. Yoon, S.-Y. Park, G.-P. Song, Y.-H. Jung, Y.-J. Jeon, S.-M. Kang and K.-N. Kim, *J. Funct. Foods*, 2012, **4**, 253–262.
390 R. Babujanarthanam, P. Kavitha, U. S. Mahadeva Rao and M. R. Pandian, *Mol. Cell. Biochem.*, 2011, **358**, 121–9.
391 J.-H. Choi, D.-W. Kim, N. Yun, J.-S. Choi, M. N. Islam, Y.-S. Kim and S.-M. Lee, *J. Nat. Prod.*, 2011, **74**, 1055–1060.
392 K. Valentová, J. Vrba, M. Bancířová, J. Ulrichová and V. Křen, *Food Chem. Toxicol.*, 2014, **68**, 267–282.
393 B.-C. Ji, W.-H. Hsu, J.-S. Yang, T.-C. Hsia, C.-C. Lu, J.-H. Chiang, J.-L. Yang, C.-H. Lin, J.-J. Lin, L.-J. W. Suen, W. Gibson Wood and J.-G. Chung, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 7596–7604.
394 P.-J. Huang, Y.-C. Hseu, M.-S. Lee, K. J. Senthil Kumar, C.-R. Wu, L.-S. Hsu, J.-W.

Liao, I.-S. Cheng, Y.-T. Kuo, S.-Y. Huang and H.-L. Yang, *Food Chem. Toxicol.*, 2012, **50**, 3489–3497.
395 S. Nabavi, S. Habtemariam, A. Di Lorenzo, A. Sureda, S. Khanjani, S. Nabavi and M. Daglia, *Nutrients*, 2016, **8**, 248.
396 A. Yüce, A. Ateşşahin, A. O. Ceribaşi and M. Aksakal, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2007, **101**, 345–349.
397 S. I. Alqasoumi, *Saudi Pharm. J.*, 2014, **22**, 258–263.
398 A. N. A. Abad, M. H. K. Nouri, A. Gharjanie and F. Tavakoli, *Chin. J. Nat. Med.*, 2011, **9**, 126–131.
399 S. Il Cho, J. E. Lee and N. Y. Do, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 2014, **78**, 474–478.
400 G. Brozovic, N. Orsolic, F. Knezevic, A. Horvat Knezevic, V. Benkovic, K. Sakic, N. Borojevic and D. Dikic, *J. Appl. Genet.*, 2011, **52**, 355–361.
401 A. Patenković, M. Stamenković-Radak, D. Nikolić, T. Marković and M. Anđelković, *J. Ethnopharmacol.*, 2013, **146**, 632–636.
402 S. Matić, J. Katanić, S. Stanić, M. Mladenović, N. Stanković, V. Mihailović and T. Boroja, *J. Ethnopharmacol.*, 2015, **174**, 287–292.

Извори фотографија преузетих са интернета:

i *http://biocyclopedia.com/index/kingdom_plantae/classification_notes_files/family/Family%20%20Rosaceae.php*

ii *http://www.botanic.jp/plants-ra/rokube.htm*
https://www.wikiwand.com/de/Kleines_M%C3%A4des%C3%BC%C3%9F
http://garden0220.ocnk.net/product/1862
https://en.wikipedia.org/wiki/Filipendula_palmata
http://www.rangedala.nu/filipendula-rubra-venusta-magnifica.html
http://www.plantarium.ru/page/image/id/22117.html

iii *http://hermionesgarden.blogspot.rs/2011/04/filipendula-ulmaria-meadowsweet.html*
http://www.wikiwand.com/de/Kleines_M%C3%A4des%C3%BC%C3%9F

iv *https://www.flickr.com/photos/50634667@N00/7545844754*
http://luirig.altervista.org/pics/display.php?pos=190374
http://biocyclopedia.com/index/kingdom_plantae/classification_notes_files/family/images/ebo04151.jpg
http://luirig.altervista.org/pics/display.php?pos=217587
http://luirig.altervista.org/pics/display.php?pos=223799

v *http://scienceblog.cancerresearchuk.org/2012/03/21/aspirin-and-cancer-the-picture-becomes-clearer/*

vi *Poster presentation: Bączek et al., Accumulation of phenolic compounds in leaves and underground organs of dropwort (Filipendula vulgaris Moench), 2011,*
http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201400116106
http://www.botanic.jp/plants-ra/rokube.htm
http://biocyclopedia.com/index/kingdom_plantae/classification_notes_files/family/images/ebo04151.jpg
http://www.eneljardin.com/2010/09/
http://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0611+0302

Биографија



Јелена Катанић рођена је 20. октобра 1988. године у Чачку. Основну школу завршила је 2003. године као носилац Вукове дипломе. Средњу медицинску школу у Чачку, смер фармацеутски техничар, завршила је са одличним успехом. Школске 2007/2008. године уписала је Природно-математички факултет у Крагујевцу, одсек хемија, смер истраживање и развој. Основне академске студије завршила је 2011. године, са просечном оценом 9.00 (девет). Исте године уписала је мастер академске студије хемије, такође на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, које је завршила 2012. године, као први мастер хемичар у историји овог факултета, са просечном оценом 10.00 (десет). Даље академско усавршавање наставила је уписивањем докторских академских студија, модул биохемија, школске 2012/2013. године, на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, под ментроством доц. др Владимира Михаиловића. У оквиру докторских студија положила је све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 10.00 (десет).

У току основних студија Јелена Катанић била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја (од 2008. до 2012. године), а као студент докторских студија била је стипендиста Министарства у току прве године студија (у оквиру пројекта бр. ОИ 172016). У звање истраживач-приправник изабрана је 26.12.2012., а у звање истраживач-сарадник 6.11.2013., са реизбором у исто звање 29.6.2016. године. Ангажована је у радни однос на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (пројекат бр. ИИИ 43004) од 14.11.2013. године. У досадашњем раду била је ангажована у извођењу практичне наставе за студенте хемије на основним и мастер академским студијама, и то у оквиру следећих предмета: Биохемија, Биохемија физиолошки активних једињења, Биохемија ћелије, Биохемија примарних биомолекула, Биохемија 2, Ензимологија и Биохемија 2 са ензимологијом.

У оквиру стипендије коју додељује Република Аустрија и Аустријска служба за академску размену (OeAD), школске 2014/2015. године провела је три месеца на стручном усавршавању на Институту за фармацију, на Универзитету у Грацу, Аустрија, а као стипендиста Аустријске службе за академску размену (OeAD) и Центра за интернационалну сарадњу и мобилност (ICM) део својих истраживања реализовала је на већ поменутом Институту у Грацу, у оквиру једномесечног боравка 2016. године, у истраживачкој групи проф. др Рудолфа Бауера. Јелена Катанић је добитник специјалног признања Српског хемијског друштва за 2012. годину за изузетан успех у току основних студија, награде Природно-математичког факултета у Крагујевцу за изузетан успех у току мастер студија (2012/2013.), награде Фондације Хемофарм, за успех у току студирања за студенте природних наука (2013.), као и гранта за учешће на годишњој конференцији Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA (2015. године).

Члан је међународног Друштва за испитивање лековитих биљака и природних производа (Society for Medicinal Plant and Natural Product Research – GA) (од 2013. године), Српског хемијског друштва (2013. године) и Друштва за физиологију биљака Србије (од 2013. године). До сада је остварила успешну сарадњу са многим иностраним научно-истраживачким групама.

Библиографија

Јелена Катанић је у досадашњем научно-истраживачком раду била аутор и/или коаутор великог броја научних публикација, у реномираним научним часописима међународног значаја (категорије М20). Поред тога, учествовала је на бројним научним конференцијама, како домаћег, тако и међународног карактера. У следећим редовима хронолошки су побројани библиографски подаци Јелене Катанић који представљају резултате њеног досадашњег истраживачког рада, а објављени су у међународним научним часописима (укупно 19) и у виду саопштења на међународним (укупно 35) и домаћим (укупно 5) научним скуповима, што збирно чини 59 библиографских јединица.

*Научне публикације проистекле из ове докторске дисертације, **6** научних публикација (**4** рада у часописима изузетне вредности – категорија **М21а**, **1** рад у врхунском међународном часопису – категорија **М21** и **1** рад у истакнутом међународном часопису – категорија **М22**) и **11** конференцијских саопштења, обележени су звездицом након редног броја (*), а публиковани научни радови са резултатима из дисертације дати су у Прилогу.*

Радови објављени у научним часописима међународног значаја (М20):

1. Vladimir Mihailović, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Jelena Arambašić, Danijela Mišić, Vesna Stanković, **Jelena Katanić**, Milan Mladenović, Slavica Solujić, Sanja Matić, Hepatoprotective effects of *Gentiana asclepiadea* L. extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats, *Food and Chemical Toxicology* 52 (2013), 83–90; DOI: 10.1016/j.fct.2012.10.034
   IF_{2012} = 3.010; **M21a** (Food Science & Technology 7/96); ISSN: 0278-6915

2. Milan Mladenović, Sanja Matić, Snežana Stanić, Slavica Solujić, Vladimir Mihailović, Nevena Stanković, **Jelena Katanić**, Combining molecular docking and 3-D pharmacophore generation to enclose the *in vivo* antigenotoxic activity of naturally occurring aromatic compounds: myricetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid, *Biochemical Pharmacology* 86 (2013), 1376–1396; DOI: 10.1016/j.bcp.2013.08.018
   IF_{2013} = 4.650; **M21a** (Pharmacology & Pharmacy 25/256); ISSN: 0006-2952;

3. Vladimir Mihailović, Sanja Matić, Danijela Mišić, Slavica Solujić, Snežana Stanić, **Jelena Katanić**, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Chemical composition, antioxidant and antigenotoxic activities of different fractions of *Gentiana asclepiadea* L. roots extract, *EXCLI Journal* 12 (2013), 807-823.
   IF_{2012} = 1.923; **M22** (Biology 27/82); ISSN: 1611-2156

4. Nevena Stanković, Milan Mladenović, Mirjana Mihailović, Jelena Arambašić, Aleksandra Uskoković, Vesna Stanković, Vladimir Mihailović, **Jelena Katanić**, Sanja Matić, Slavica Solujić, Nenad Vuković, Slobodan Sukdolak, Synthesis and toxicological studies of *in vivo* anticoagulant activity of novel 3-(1-aminoethylidene)chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-*2H*-chromen-2-ones combined with a structure-based 3-D pharmacophore model, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 55 (2014), 20–35; DOI: 10.1016/j.ejps.2014.01.004
   IF_{2014} = 3.35; **M21** (Pharmacology & Pharmacy 66/255); ISSN: 0928-0987

5. Vladimir Mihailović, **Jelena Katanić**, Danijela Mišić, Vesna Stanković, Mirjana Mihailović, Aleksandra Uskoković, Jelena Arambašić, Slavica Solujić, Milan Mladenović, Nevena Stanković,

Hepatoprotective effects of secoiridoids-rich extracts from *Gentiana cruciata* L. against carbon tetrachloride induced liver damage in rats, *Food & Function* 5 (2014), 1795–1803; DOI: 10.1039/c4fo00088a
IF_{2014} = 2.791; **M21** (Food Science & Technology 17/122); ISSN: 2042-6496

6. *** Jelena Katanić**, Vladimir Mihailović, Nevena Stanković, Tatjana Boroja, Milan Mladenović, Slavica Solujić, Milan S. Stanković, Miroslav M. Vrvić, Dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.): Potential role as antioxidant and antimicrobial agent, *EXCLI Journal* 14 (2015), 1–20; DOI: 10.17179/excli2014-479
IF_{2015} = 1.292; **M22** (Biology 46/86); ISSN: 1611-2156

7. 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* 227 (2015), 18–31; DOI:10.1016/j.cbi.2014.12.005
IF_{2015} = 2.618; **M22** (Biochemistry & Molecular Biology 148/289); ISSN: 0009-2797;

8. *** Jelena Katanić**, Tatjana Boroja, Nevena Stanković, Vladimir Mihailović, Milan Mladenović, Samo Kreft, Miroslav M. Vrvić, Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *Food & Function* 6 (2015), 1164–1175; DOI: 10.1039/c4fo01208a
IF_{2015} = 2.686; **M21** (Food Science & Technology 25/125); ISSN: 2042-6496

9. Vladimir Mihailović, Danijela Mišić, Sanja Matić, Mirjana Mihailović, Snežana Stanić, Miroslav M. Vrvić, **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* 73 (2015), 49–62; DOI: 10.1016/j.indcrop.2015.04.013
IF_{2015} = 3.449; **M21a** (Agronomy 6/83); ISSN: 0926-6690

10. *** 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* 18 (2015), 198–212; DOI: 10.1016/j.jff.2015.07.004, corr. 28, 2017, 326–327. DOI: 10.1016/j.jff.2016.11.017
IF_{2015} = 3.973; **M21a** (Food Science & Technology 8/125); ISSN: 1756-4646

11. ***** Sanja Matić, **Jelena Katanić**, Snežana Stanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković, Vladimir Mihailović, Tatjana Boroja, *In vivo* and *in vitro* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts, *Journal of Ethnopharmacology* 174 (2015), 287–292; DOI: 10.1016/j.jep.2015.08.025, corr. 200, 2017, 236. DOI: 10.1016/j.jep.2017.02.030
IF_{2015} = 3.055; **M21a** (Integrative & Complementary Medicine 2/24); ISSN: 0378-8741

12. 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 IIα: A story behind the molecular modeling approach, *Biochemical Pharmacology* 98 (2015), 243–266; DOI: 10.1016/j.bcp.2015.08.106
IF_{2015} = 5.091; **M21a** (Pharmacology & Pharmacy 18/255); ISSN: 0006-2952

13. Ramazan Ceylan, **Jelena Katanić,** Gokhan Zengin, Sanja Matić, Abdurrahman Aktumsek, Tatjana Boroja, Snežana Stanić, Vladimir Mihailović, Gokalp Ozmen Guler, Mehmet Boga, Mustafa Abdullah Yılmaz, Chemical and Biological Fingerprints of Two Fabaceae species (*Cytisopsis dorycniifolia* and *Ebenus hirsuta*): Are they Novel Sources of Natural Agents for Pharmaceutical and Food Formulations?, *Industrial Crops and Products* 84 (2016), 254–262; DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.02.019
IF_{2015} = 3.449; **M21a** (Agronomy 6/83); ISSN: 0926-6690

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* 193 (2016), 627–636; DOI: 10.1016/j.jep.2016.10.015, corr. 198 (2017), 608–609. DOI: 10.1016/j.jep.2017.02.012
IF_{2015} = 3.055; **M21a** (Integrative & Complementary Medicine 2/24); ISSN: 0378-8741

15. *** Jelena Katanić**, Sanja Matić, Eva-Maria Pferschy-Wenzig, Nadine Kretschmer, Tatjana Boroja, Vladimir Mihailović, Vesna Stanković, Nevena Stanković, Milan Mladenović, Snežana Stanić, Mirjana 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* 99 (2017), 86–102; DOI: 10.1016/j.fct.2016.11.018
IF_{2016} = 3.778; **M21a** (Food Science & Technology 8/129); ISSN: 0278-6915

16. **Jelena Katanić**, Ramazan Ceylan, Sanja Matić, Tatjana Boroja, Gokhan Zengin, Abdurrahman Aktumsek, Vladimir Mihailović, Snežana Stanić, Novel perspectives on two Digitalis species: Phenolic profile, bioactivity, enzyme inhibition, and toxicological evaluation, *South African Journal of Botany* 109 (2017), 50–57; DOI: 10.1016/j.sajb.2016.12.004
IF_{2016} = 1.427; **M22** (Plant Sciences 97/211); ISSN: 0254-6299

17. 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* xxx (2017), 1-10. in press; DOI: 10.1007/s11010-017-3014-0
IF_{2016} = 2.669; **M23** (Cell Biology 115/189); ISSN: 0300-8177

18. 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* xxx (2017), 1-14. in press; DOI: 10.1016/j.fct.2017.04.004
IF_{2016} = 3.778; **M21a** (Food Science & Technology 8/129); ISSN: 0278-6915

19. Anka Pejović, Ivan Damljanović, Dragana Stevanović, Aleksandra Minić, Jovana Jovanović, Vladimir Mihailović, **Jelena Katanić**, Goran A. Bogdanović, Synthesis, characterization and

antimicrobial activity of novel ferrocene containing quinolines: 2-ferrocenyl-4-methoxyquinolines, 1-benzyl-2-ferrocenyl-2,3-dihydroquinolin-4(1*H*)-ones and 1-benzyl-2-ferrocenylquinolin-4(1*H*)-ones, *Journal of Organometallic Chemistry* 846 (2017), 6-17; DOI: 10.1016/j.jorganchem.2017.05.051
IF_{2016} = 2.184; **M22** (Chemistry, Organic 27/59); ISSN: 0022-328X

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M_{34}):

1. V. Mihailović, **J. Katanić**, M. Mihailović, K. Šipovac, V. Stanković, S. Solujić, M. Mladenović, N. Stanković, S. Matić, Hepatoprotective activity of methanolic extract of root of *Gentiana asclepiadea* L. in carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats, *32nd Balkan Medical Week*, 21-23. September 2012. University of Nis, Nis, Serbia.
2. S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, N. Stanković, M. Mladenović, **J. Katanić**, V. Mihailović, Antigenotoxic and antioxidant properties of the methanolic extract obtained from the underground parts of *Gentiana cruciata*, *32nd Balkan Medical Week*, 21-23 September 2012, University of Nis, Nis, Serbia.
3. *** J. Katanić**, V. Mihailović, S. Solujić, M. Stanković, N. Stanković, S. Matić, M. Mladenović, Radical scavenger activity and chelating ability of *Filipendula hexapetala* Gilib. root extract, *1st International Conference on Plant Biology*, 4-7 June 2013, Subotica, Serbia, p. 93, (ISBN 978-86-912591-2-9).
4. M. Koraćević-Maslak, **J. Katanić**, V. Mihailović, *In vitro* antioxidant activity of methanol extract of *Bergenia cordifolia* rhizome, *1st International Conference on Plant Biology*, 4-7 June 2013, Subotica, Serbia. p. 92-93, (ISBN 978-86-912591-2-9).
5. S. Matić, S. Stanić, D. Bogojević, S. Solujić, M. Mladenović, N. Stanković, V. Mihailović, **J. Katanić**, M. Mihailović, Chemical composition, antioxidant and antigenotoxic activities of *Cotinus coggyria* stem extract, *1st International Conference on Plant Biology*, 4-7 June 2013, Subotica, Serbia, p. 90-91, (ISBN 978-86-912591-2-9).
6. V. Mihailović, **J. Katanić**, M. Mihailović, D. Mišić, S. Solujić, K. Šipovac, V. Stanković, M. Mladenović, N. Stanković, Secoiridoid content and hepatoprotective activity of *Gentiana cruciata* L. root extract, *1st International Conference on Plant Biology*, 4-7 June 2013, Subotica, Serbia, p. 91-92, (ISBN 978-86-912591-2-9).
7. *** J. Katanić**, V. Mihailović, S. Solujić, N. Stanković, M. Mladenović, Protective effect of *Filipendula hexapetala* Gilib. root extract on lipid oxidation in different model systems, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8)*, 27-29 June 2013, Belgrade, Serbia, p. 234, (ISBN 978-86-7132-053-5).
8. V. Mihailović, D. Mišić, **J. Katanić**, M. Mihailović, S. Solujić, V. Stanković, M. Mladenović, N. Stanković, Phytochemical profiling by UHPLC-DAD/+-HESI-MS/MS analyzes and hepatoprotective activity of *Gentiana cruciata* L. against CCl_4 induced liver injury in Wistar rats, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8)*, 27-29 June 2013, Belgrade, Serbia, p. 220, (ISBN 978-86-7132-053-5).
9. M. Mladenović, N. Stanković, V. Mihailović, **J. Katanić**, S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, Toxicological and receptor-based 3-D QSAR studies of *in vivo* anticoagulant activity of novel 3-(1-aminoethylidene)chroman-2,4-diones and 4-hydroxy-3-(1-iminoethyl)-*2H*-chromen-2-ones, *8th*

International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8), 27-29 June 2013, Belgrade, Serbia, p. 107, (ISBN 978-86-7132-053-5).

10. M. Mladenović, S. Matić, S. Stanić, S. Solujić, V. Mihailović, N. Stanković, **J. Katanić**, Molecular docking provides understanding of the *in vivo* antigenotoxic activity of naturally occurring aromatic compounds: myrcetin, quercetin, rutin, and rosmarinic acid against ethyl methanesulfonate, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8)*, 27-29 June 2013, Belgrade, Serbia, p. 114, (ISBN 978-86-7132-053-5).
11. N. Stanković, M. Mladenović, S. Matić, S. Stanić, **J. Katanić**, V. Mihailović, T. 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* (Kladovo, Serbia, Sept. 28th-Oct. 2nd, 2014), p. 149, (ISBN 978-86-87109-10-0).
12. N. Stanković, S. Matić, S. Stanić, M. Mladenović, **J. Katanić**, V. Mihailović, T. 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* (Kladovo, Serbia, Sept. 28th-Oct. 2nd, 2014), (ISBN 978-86-87109-10-0).
13. * **J. Katanić**, V. Mihailović, T. Boroja, N. Stanković, M. Mladenović, Meadowsweet as underestimated food additive against lipid oxidation, *XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid, Republic of Macedonia, 8-11 October, 2014, p. 71, (ISBN 978-9989-668-99-9).
14. T. Boroja, V. Mihailović, **J. Katanić**, N. Stanković, M. Mladenović, Phenolic profile and antioxidant activity of *Alchemilla vulgaris* L., *XXIII Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid, Republic of Macedonia, 8-11 October, 2014, p. 70, (ISBN 978-9989-668-99-9).
15. **J. Katanić**, S. Matić, T. Boroja, R. Ceylan, G. Zengin, A. Aktumsek, S. Stanić, V. 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. 104-105, (ISBN 978-86-912591-3-6).
16. * **J. Katanić**, S. Matić, S. Stanić, M. Mladenović, N. Stanković, V. Mihailović, T. Boroja, V. Maksimović, HPLC analysis and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula ulmaria* methanolic extract, *2nd International Conference on Plant Biology*, 17-20 June 2015, Petnica, Serbia, p. 105, (ISBN 978-86-912591-3-6).
17. T. Boroja, V. Mihailović, **J. Katanić**, M. Stanković, N. Stanković, M. 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).
18. * **J. Katanić**, V. Mihailović, S. Matić, E. M. Pferschy-Wenzig, R. Bauer, N. Stanković, T. Boroja, Nephroprotective effect of dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.) on cisplatin-induced toxicity in rats, *63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research*, 23-27 August 2015, Budapest, Hungary, *Planta Medica* 2015; 81 - PM_159, DOI: 10.1055/s-0035-1565536
19. * **J. Katanić**, E.-M. Pferschy-Wenzig, R. Bauer, V. Mihailović, Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.): LC-MS phenolic characterization and ameliorating effect on cisplatin-induced hepatotoxicity, *63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant*

and Natural Product Research, 23-27 August 2015, Budapest, Hungary, *Planta Medica* 2015; 81 - PM_09, DOI: 10.1055/s-0035-1565386

20. R. Ceylan, G. Zengin, S. Matić, **J. Katanić**, S. Stanić, A. Aktumsek, Antioxidant and antigenotoxic properties of *Digitalis ferruginea* subsp. *ferruginea* endemic plant from Turkey, *2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU 2015)*, 14-17 October 2015, Plovdiv, Bulgaria, Book of Abstracts, p. 129.
21. T. Boroja, V. Mihailović, **J. Katanić**, M. Mladenović, N. Stanković, *Satureja hortensis* L. as a potential antimicrobial agent, *2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU 2015)*, 14-17 October 2015, Plovdiv, Bulgaria, Book of Abstracts, p. 123.
22. **J. Katanić**, S. Nikles, S.-P. Pan, R. Bauer, V. Mihailović, T. Boroja, N. Stanković, M. Mladenović, Phenolic content and anti-inflammatory activity of uninvestigated *Stellaria holostea* methanolic extract, *III Simposium of biologists and ecologists of Republika Srpska* (SBERS 2015), 12-14 November 2015, Banja Luka, Republika Srpska, Book of Abstracts p. 115, (ISBN 978-99955-21-43-1).
23. **J. Katanić**, S. Matić, S. Stanić, M. Mladenović, N. Stanković, V. Mihailović, T. Boroja, *In vitro* protective effect of methanol extracts of *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* against hydroxyl radical-induced DNA damage, *III Simposium of biologists and ecologists of Republika Srpska* (SBERS 2015), 12-14 November 2015, Banja Luka, Republika Srpska, Book of Abstracts p. 116, (ISBN 978-99955-21-43-1).
24. V. Mihailović, M. Koraćević-Maslak, **J. Katanić**, V. Maksimović, T. Boroja, M. Mladenović, N. Stanković, Phytochemical and antimicrobial activity evaluations of *Bergenia cordifolia* root extract, *III Simposium of biologists and ecologists of Republika Srpska* (SBERS 2015), 12-14 November 2015, Banja Luka, Republika Srpska, Book of Abstracts p. 119, (ISBN 978-99955-21-43-1).
25. N. Stanković, M. Mladenović, S. Matić, S. Stanić, M. Mihailović, V. Mihailović, **J. Katanić**, T. Boroja, N. Vuković, Newly discovered chroman-2,4-diones neutralize DNA alkylation damage in vivo on topIIα level: A story behind the molecular modeling approach, *III Simposium of biologists and ecologists of Republika Srpska* (SBERS 2015), 12-14 November 2015, Banja Luka, Republika Srpska, Book of Abstracts p. 118, (ISBN 978-99955-21-43-1).
26. *** J. Katanić**, T. Boroja, V. Mihailović, S. Nikles, S.-P. Pan, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, R. Bauer, Anti-inflammatory potential of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*): *In vitro* and *in vivo* analysis, *XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid, Republic of Macedonia, 11-14 September, 2016, Book of Abstracts p. 81, (ISBN 978-9989-760-13-6).
27. **J. Katanić**, T. Boroja, S.-P. Pan, S. Nikles, R. Bauer, V. Mihailović, M. Mladenović, N. Stanković, N. Mihović, *Lunaria annua* L. (Annual Honesty) as a new antioxidant and anti-inflammatory agent, *XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid, Republic of Macedonia, 11-14 September, 2016, Book of Abstracts p. 82, (ISBN 978-9989-760-13-6).
28. T. Boroja, **J. Katanić**, V. Mihailović, S. Nikles, S.-P. Pan, R. Bauer, M. S. Stanković, *In vitro* anti-inflammatory activity assessment of Lady's mantle, *XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid, Republic of Macedonia, 11-14 September, 2016, Book of Abstracts p. 83, (ISBN 978-9989-760-13-6).
29. T. Boroja, V. Mihailović, **J. Katanić**, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, M. Mladenović, N. Stanković, N. Mihović, Hepatoprotective efficiacy of Summer savory against cisplatin-induced

oxidative damage in rats, *XXIV Congress of Chemists and Technologists of Macedonia*, Ohrid, Republic of Macedonia, 11-14 September, 2016, Book of Abstracts p. 84, (ISBN 978-9989-760-13-6).

30. * **J. Katanić**, T. Boroja, V. Mihailović, S. Matić, N. Stanković, N. Mihović, M. Mladenović, V. Stanković, Protective effects of *Filipendula ulmaria* extracts on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU – UNS Bioscience Conference* (IBSC 2016), Novi Sad, Serbia, 19-21 September, 2016, Book of Abstracts p. 265-267.
31. **J. Katanić**, T. Boroja, S. Nikles, S.-P. Pan, V. Mihailović, R. Bauer, Garlic mustard (*Alliaria petiolata*) – Unrewarded spice with antioxidant and anti-inflammatory properties, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU – UNS Bioscience Conference* (IBSC 2016), Novi Sad, Serbia, 19-21 September, 2016, Book of Abstracts p. 215-216.
32. T. Boroja, V. Mihailović, **J. Katanić**, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, V. Stanković, M. Mladenović, N. Stanković, N. Mihović, Nephroprotective effect of *Satureja hortensis* L. against cisplatin-induced toxicity, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU – UNS Bioscience Conference* (IBSC 2016), Novi Sad, Serbia, 19-21 September, 2016, Book of Abstracts p. 268-269.
33. T. Boroja, **J. Katanić**, V. Mihailović, S.-P. Pan, S. Nikles, R. Bauer, Rosmarinic acid-rich extract of Summer savory exhibits strong anti-inflammatory activity, *The International Bioscience Conference and the 6th International PSU – UNS Bioscience Conference* (IBSC 2016), Novi Sad, Serbia, 19-21 September, 2016, Book of Abstracts p. 250-251.
34. J. Jovanović, I. Damljanović, **J. Katanić**, T. 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), Châtenay-Malabry, France, 8-10 February, 2017, Book of Abstracts p. 206.
35. * **J. Katanić**, V. Mihailović, T. Boroja, E.-M. Pferschy-Wenzig, S. Nikles, S.-P. Pan, G. Rosić, D. Selaković, J. Joksimović, R. Bauer, Biochemical insights on *Filipendula hexapetala* Gilib. (Rosaceae): A promising source of bioactive compounds with anti-inflammatory properties, *Summer School, Medicinal Chemistry – State of Art and Perspectives*, Vrnjačka Banja, Serbia, 26-31 August , 2017, Accepted for presentation.

Саопштења са скупова националног значаја штампана у целини (M_{63}):

1. * **J. Katanić**, V. Mihailović, N. Stanković, M. Mladenović, S. Solujić, M. Stanković, Antioksidativna aktivnost metanolskog ekstrakta korena biljke *Filipendula hexapetala* Gilib., *Zbornik radova XVIII savetovanja o biotehnologiji* (Agronomski fakultet, Čačak, 15-16. mart 2013.), Čačak, 2013, p. 471-476, (ISBN 978-86-87611-29-0).
2. * **J. Katanić**, V. Mihailović, M. Koraćević-Maslak, N. Stanković, T. Boroja, M. Mladenović, Stability of dropwort root extract and its effect on lipid oxidation in meat, *Zbornik radova XIX savetovanja o biotehnologiji* (Agronomski fakultet, Čačak, 7-8. mart 2014.), Čačak, 2014, p. 239-244, on Serbian, (ISBN 978-86-87611-31-3).
3. T. Boroja, V. Mihailović, **J. Katanić**, N. Stanković, M. Mladenović, *Alchemilla vulgaris* L. as a potential source of natural antioxidants, *Zbornik radova XIX savetovanja o biotehnologiji*

(Agronomski fakultet, Čačak, 7-8. mart 2014.), Čačak, 2014, p. 233-237, on Serbian, (ISBN 978-86-87611-31-3).

4. M. Koraćević-Maslak, **J. Katanić**, V. Mihailović, M. Stanković, Antioxidant activity of the methanol leaf extract of *Saxifraga rotundifolia* L., *Zbornik radova XIX savetovanja o biotehnologiji* (Agronomski fakultet, Čačak, 7-8. mart 2014.), Čačak, 2014, p. 341-346, on Serbian, (ISBN 978-86-87611-31-3).

Саопштења са скупова националног значаја штампана у изводу (M_{64}):

1. V. Mihailović, M. Arsić, M. Stojadinović, S. Stajić, T. Boroja, **J. Katanić**, M. Mladenović, N. Stanković, Fruits of blackthorn (*Prunus spinosa*) and hawthorn (*Crataegus laevigata*) as potential antioxidants and their stability during *in vitro* digestion, *53rd Meeting of the Serbian Chemical Society*, 10-11 June 2016, Kragujevac, Serbia, Program and Book of Abstracts p. 85, (ISBN 978-86-7132-056-6).

Прилог

EXCLI Journal 2015;14:1-20 – ISSN 1611-2156
Received: July 10, 2014, accepted: October 17, 2014, published: January 06, 2015

Original article:

DROPWORT (*Filipendula hexapetala* Gilib.): POTENTIAL ROLE AS ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL AGENT

Jelena Katanić[1]*, Vladimir Mihailović[1], Nevena Stanković[1], Tatjana Boroja[1], Milan Mladenović[1], Slavica Solujić[1], Milan S. Stanković[2], Miroslav M. Vrvić[3]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[2] Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[3] Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, P.O. Box 51, 11158 Belgrade, Serbia

* Corresponding author: Jelena Katanić, Faculty of Science, University of Kragujevac, Serbia; Tel.: +381 34336223; Fax: +381 34335040; E-mail address: jkatanic@kg.ac.rs

http://dx.doi.org/10.17179/excli2014-479

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Licence (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of the methanolic extracts of *Filipendula hexapetala* Gilib. aerial parts (FHA) and roots (FHR) and their potential in different model systems, as well as antimicrobial activity. According to this, a number of assays were employed to evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of *F. hexapetala* extracts. In addition, the antioxidant activity assays in different model systems were carried out, as well as pH, thermal and gastrointestinal stability studies. The phenolic compounds contents in FHA and FHR were also determined. The results showed that *F. hexapetala* extracts had considerable antioxidant activity *in vitro* and a great stability in different conditions. The extracts exhibited antimicrobial activity against most of the tested bacterial and fungal species. Also, the extracts contain high level of phenolic compounds, especially aerial parts extract.

Keywords: *Filipendula hexapetala* Gilib., phenolic compounds, antioxidant activity, stability, *in vitro* digestion, antimicrobial activity

INTRODUCTON

Reactive oxygen species (ROS) produced as a result of an imbalance inside the cell are believed to be greatly responsible for the development of many diseases, like chronic inflammations, heart disease, neurodegenerative disorders, and cancer (Lin and Chang, 2013). In a biological system, the main components which prevent or markedly delay oxidation of substrate (carbohydrates, proteins, lipids and DNA) are commonly known as antioxidants. Their physiological role is to prevent damage of the cellular components (Nićiforović et al., 2010). Food is a multicomponent system composed of different biomolecules which could react with ROS. In this case, antioxidants could be used as food additives to preserve food by retarding deterioration, rancidity, or discoloration due to the oxidation (Wanasundara and Shahidi, 2005). Since many herbs, plants, vegetables, and fruits extracts or powders have antioxidant properties, there is an increasing interest in natural sources of antioxidant molecules for use in the food, because the synthetic antioxidants, such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT),

Food & Function

PAPER



Cite this: *Food Funct.*, 2015, **6**, 1164

Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.

Jelena Katanić,*[a] Tatjana Boroja,[a] Nevena Stanković,[a] Vladimir Mihailović,[a] Milan Mladenović,[a] Samo Kreft[b] and Miroslav M. Vrvić[c]

Received 30th December 2014,
Accepted 4th February 2015

DOI: 10.1039/c4fo01208a

www.rsc.org/foodfunction

The purpose of the present study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial potential of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. methanolic extracts, their stabilities under different pH and thermal conditions and *in vitro* digestibility. The results showed a considerable content of phenolic compounds in the extracts, especially total phenolic acids (47.47 mg CAE g^{-1}) and flavonoids (45.47 mg RUE g^{-1}) in aerial parts. HPLC analysis indicated the presence of spiraeoside in the aerial part extract. The extracts revealed an interesting antimicrobial effect against the tested microorganisms, especially bacteria *E. coli* and *E. faecalis* (MIC 0.156–0.625 mg mL^{-1}), and fungi *P. cyclopium* and *F. oxysporum* (MIC 2.5–5 mg mL^{-1}). The extracts exerted high antioxidant activities, particularly the root extract, paralleled by their considerable activities against the lipid oxidation process. The results of this study suggest that both extracts potentially could be functional food ingredients considering their good antioxidant and antimicrobial activities, and stability under different conditions.

1. Introduction

Filipendula ulmaria L. Maxim. (Rosaceae, syn. *Spiraea ulmaria* L. – meadowsweet, queen of the meadow) is a perennial herb with creamy-white flowers, a short, pink rhizome and stems 50–120 cm high. It can be found in meadows, swamps, and areas with higher humidity in Europe and Asia. Dried flowers, leaves, the whole herb and the rhizomes are used medicinally as drugs.[1] The medicinal parts of the plant contain a number of phenolic compounds including phenolic acids (gallic acid, salicylic acid, ellagic acid, caffeic acid derivatives), flavonoids (catechin, kaempferol, astragalin, quercetin, hyperoside, quercitrin, rutin, spiraeoside), hydrolysable and condensed tannins, and salicylate aglycons and glycosides.[2–5] The phenolic content of *F. ulmaria* is highly related to its pharmacological effect, including antipyretic, anti-inflammatory, anti-rheumatic, analgesic, astringent, stomachic and diuretic effects.[2] The herb and the flowers are traditionally used for fevers, gout, infections and urinary problems or minor painful joint conditions. The flowers are a component of some mixed herbal teas, as remedies for influenza and rheumatism, and kidney-bladder teas.[6,7]

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS) are well recognized as deleterious because their overproduction results in oxidative stress, a process which leads to destruction of biomolecules like lipids, proteins, and DNA. The ROS are associated with the induction of diseases such as cancer, cardiovascular disease, atherosclerosis, hypertension, diabetes mellitus, neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease), rheumatoid arthritis, and aging.[8,9] The existence of defensive compounds called antioxidants is essential, because they play a significant role in alleviating or preventing the oxidation of other molecules that are more easily oxidized. Antioxidants are also added to a variety of foods to prevent or deter free radical-induced lipid oxidation and to extend the shelf-life of food products, mainly diary and meat products.[10] On the other hand, a decrease in the quality of food could also cause production of a wide range of microorganisms. The increased use of natural antimicrobial compounds for food preservation is justified by the number of positive results that have been published in the past few decades. Plant extracts and essential oils, as well as pure natural substances isolated from the plants, are in usage as additives for food preservation due to their excellent antimicrobial properties.[11,12] There has been growing interest in the investigation of natural products for the discovery of compounds which possess both antioxidant and antimicrobial activities and have no harmful repercussions on human health.

[a]*Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: jkatanic@kg.ac.rs; Fax: +381 34335040; Tel: +381 34336223*
[b]*Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Aškerčeva cesta 7, Ljubljana SI-1000, Slovenia*
[c]*Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, P.O. Box 51, 11158 Belgrade, Serbia*

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Journal of Functional Foods 18 (2015) 198–212

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

The ameliorating effect of *Filipendula hexapetala* extracts on hepatorenal toxicity of cisplatin

Jelena Katanić [a,*], *Vladimir Mihailović* [a], *Sanja Matić* [b], *Vesna Stanković* [c], *Nevena Stanković* [a], *Tatjana Boroja* [a], *Milan Mladenović* [a], *Snežana Stanić* [b], *Samo Kreft* [d], *Mirjana Mihailović* [e]

[a] *Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia*

[b] *Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia*

[c] *Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia*

[d] *Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Aškerčeva cesta 7, Ljubljana SI-1000, Slovenia*

[e] *Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 May 2015
Received in revised form 8 July 2015
Accepted 10 July 2015
Available online

Keywords:
Filipendula hexapetala
HPLC analysis
Cisplatin
Nephrotoxicity
Hepatotoxicity
Antigenotoxic effect

ABSTRACT

The effects of the methanolic extracts of *Filipendula hexapetala* Gilib. aerial parts (FHA) and roots (FHR) against cisplatin induced kidney and liver injuries in rats were investigated as well as determination of genotoxicity and antigenotoxicity of the extracts. Treatment with FHA and FHR significantly decreased levels of urea, uric acid, serum transaminases, alkaline phosphatase and γ-glutamyl transferase, and increased the content of total protein. In addition, treatment with the extracts significantly attenuated the cisplatin-induced oxidative stress in kidney and liver tissues by increasing catalase and superoxide dismutase activities and the content of reduced glutathione and decreasing the content of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The histopathological studies confirmed the protective effects of the extracts against cisplatin-induced kidney and liver injuries. The extracts ameliorated cisplatin-induced genotoxicity. These results suggest that *F. hexapetala* extracts are effective nephro- and hepatoprotective agents, with potential to reduce oxidative stress and ameliorate cisplatin-induced nephro- and hepatotoxicity.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

There has been an increasing interest in the health enhancing role of functional foods or physiologically-active food compounds. One of the most important traits of some functional food ingredients, in addition to their nutritional values, is their physiological benefit. Many recent studies have reported that components of plant-based diet play a very important role in health promotion (Crozier, Jaganath, & Clifford,

* *Corresponding author.* Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. Tel.: +381 34336223; fax: +381 34335040.
E-mail address: jkatanic@kg.ac.rs (J. Katanić).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.004
1756-4646/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal of Functional Foods 28 (2017) 326–327

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff

Corrigendum to "The ameliorating effect of *Filipendula hexapetala* extracts on hepatorenal toxicity of cisplatin" [J. Funct. Foods 18(A) (2015) 198–212]

Jelena Katanić [a,*], Vladimir Mihailović [a], Sanja Matić [b], Vesna Stanković [c], Nevena Stanković [a], Tatjana Boroja [a], Milan Mladenović [a], Snežana Stanić [b], Samo Kreft [d], Mirjana Mihailović [e]

[a] Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[b] Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[c] Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
[d] Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, Aškerčeva cesta 7, Ljubljana SI-1000, Slovenia
[e] Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia

The authors regret that in Fig. 3 inadvertently was incorporated two photographs of the same tissue preparation of group VII (Fig. 3VII and X). They would like to inform that this wrong figure did not change the results of their study. The accurate representative photograph of kidney sections of experimental animals from group X (Fig. 3X in Fig. 3) is given below.

The authors would like to apologize for any inconvenience caused.

DOI of original article: http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.07.004
* Corresponding author. Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. Tel.: +381 34336223; fax: +381 34335040.
E-mail address: jkatanic@kg.ac.rs (J. Katanić).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.017

Journal of Ethnopharmacology 174 (2015) 287–292

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Ethnopharmacological communication

In vitro and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts

Sanja Matić [a,*], Jelena Katanić [b], Snežana Stanić [a], Milan Mladenović [b], Nevena Stanković [b], Vladimir Mihailović [b], Tatjana Boroja [b]

[a] Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[b] Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 February 2015
Received in revised form
24 July 2015
Accepted 20 August 2015
Available online 21 August 2015

Keywords:
Filipendula hexapetala
Filipendula ulmaria
DNA damage
Antigenotoxicity

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The two species of *Filipendula* genus, *Filipendula hexapetala* Gilib. and *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim are a traditional herbal medicine widely used to treat haemorrhoids, diarrhoea, fever, rheumatism and arthritic pain, kidney problems, to stop bleeding, and the common cold, as well as food supplements. However, no scientific study has been performed to validate genotoxic and/or antigenotoxic potentials of these two Filipendula species.
Aim of the study: The aim of the present study was to examine the genotoxic and possible *in vitro* and *in vivo* DNA protection potential of methanol extracts of *F. hexapetala* and *F. ulmaria*.
Materials and methods: The genotoxicity of different concentrations of *F. hexapetala* and *F. ulmaria* methanol extracts from roots and aerial parts (20, 40 and 80 mg/ml), mixed with standard food for *Drosophila*, was evaluated *in vivo* in the anterior midgut of *Drosophila melanogaster* using a modified alkaline comet assay. The protective effects of the highest dose of extracts were observed in somatic cells of third-instar larvae against ethyl methanesulphonate (EMS)-induced genotoxicity. Also, DNA protection activity of methanol extracts from *F. hexapetala* and *F. ulmaria* (100, 200, and 400 μg/ml) against hydroxyl radical-induced DNA damage was determined under *in vitro* conditions.
Results: The results showed that methanol extracts from the root and aerial part of *F. hexapetala* at a concentration of 20 mg/ml indicated the absence of genotoxicity. Also, there were no statistically significant differences in total scores between any of the groups treated with *F. ulmaria* root extract and the negative control group, while *F. ulmaria* aerial part extract possess weak genotoxic effects depending on the concentrations. The percentage reduction in DNA damage was more evident in the group of larvae simultaneously treated with EMS and the highest dose of *F. hexapetala* root or aerial part extracts and *F. ulmaria* root extract (91.02, 80.21, and 87.5%, respectively) and less expressive in the group simultaneously treated with *F. ulmaria* aerial part extract (54.7%). *F. hexapetala* root and aerial part extracts and *F. ulmaria* root extract possess strong capabilities to protect DNA from being damaged by hydroxyl radicals.
Conclusions: It can be concluded that *F. hexapetala* root and aerial part extracts and *F. ulmaria* root extract demonstrated the absence of genotoxic activity. The extracts appeared to have antigenotoxic effect, reducing the levels of DNA damage induced by EMS by more than 80%. Also, *F. hexapetala* root and aerial part extracts and *F. ulmaria* root extracts could effectively protect against hydroxyl radical-induced DNA damage.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

There is increasing interest in the investigation of natural substances of plant origin with lower risk of side effects than synthetic drugs used in conventional medicine (Celik, 2012). Many plants used as food or to treat various diseases in traditional medicine may have toxic features that will result in damage to the human body, including the induction of genetic damage (Moreira et al., 2014; Gateva et al., 2015). Also, most traditional medicinal plants have never been subjected to toxicological tests. For this reason, it is important to screen plants applied in traditional medicine for their genotoxic potency.

Genotoxic and antigenotoxic effects of plant extracts have been evaluated using various genotoxicity tests and experimental organisms (Oyeyemi and Bakare, 2013; Munari et al., 2014; Vijaya

* Corresponding author. Fax: +381 34 335 040.
E-mail address: sanjamatic@kg.ac.rs (S. Matić).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.025
0378-8741/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Journal of Ethnopharmacology 200 (2017) 236

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Corrigendum

Corrigendum to "*In vitro* and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts" [J. Ethnopharmacol. 174 (2015) 287–292]

Sanja Matić[a,*], Jelena Katanić[b], Snežana Stanić[a], Milan Mladenović[b], Nevena Stanković[b], Vladimir Mihailović[b], Tatjana Boroja[b]

[a] *Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia*
[b] *Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia*

During the assembly of Fig. 2A and B, an incorrect gel image in Fig. 2A was inadvertently included. It should be replaced with the correct one as below.

This error does not change the scientific conclusions of the article in any way since results of relative density data in the graphs were presented with originally obtained values. The authors would like to apologise for any inconvenience caused.

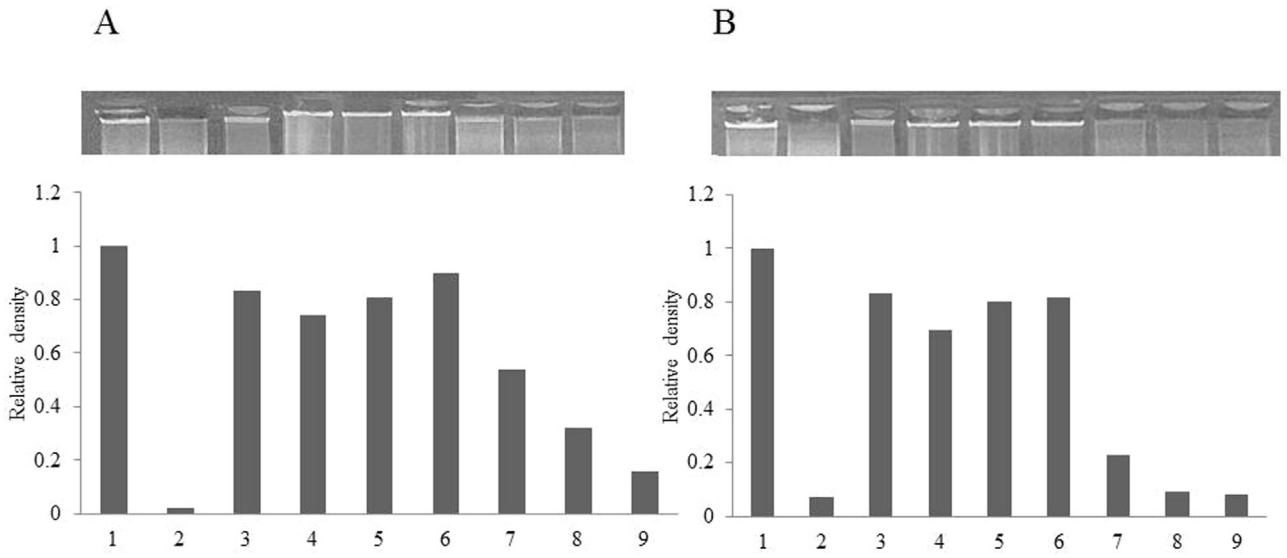


Fig. 2. DNA protection activity of (A) *Filipendula hexapetala* and (B) *Filipendula ulmaria* methanol extracts from roots and aerial parts on hydroxyl radical-induced DNA damage. Lane 1, DNA control; Lane 2, DNA damage control; Lane 3, gallic acid; Lanes 4-6, *F. hexapetala* or *F. ulmaria* extracts from roots (100, 200, and 400 μg/ml) respectively; Lanes 7-9, *F. hexapetala* or *F. ulmaria* extracts from aerial parts (100, 200, and 400 μg/ml) respectively.

DOI of original article: http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.025
* Corresponding author.
E-mail address: sanjamatic@kg.ac.rs (S. Matić).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.030

Available online 23 February 2017
0378-8741/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal of Ethnopharmacology 193 (2016) 627–636

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

In vitro and *in vivo* assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent

Jelena Katanić[a,*], Tatjana Boroja[a], Vladimir Mihailović[a], Stefanie Nikles[b], San-Po Pan[b], Gvozden Rosić[c], Dragica Selaković[c], Jovana Joksimović[c], Slobodanka Mitrović[d], Rudolf 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, 8010 Graz, Austria
[c] Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
[d] Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:
hyperoside (PubChem CID: 5281643)
rutoside (PubChem CID: 5280805)
apigenin (PubChem CID: 5280443)
spiraeoside (PubChem CID: 5320844)
quercetin (PubChem CID: 5280343)
isoquercitrin (PubChem CID: 5280804)
indomethacin (PubChem CID: 3715)
NS-398 (PubChem CID: 4553)
dexamethasone (PubChem CID: 5743)
λ-carrageenan (PubChem CID: 91972149)

Keywords:
Filipendula ulmaria
Inflammation
Cyclooxygenase
Hot plate test
Carrageenan-induced edema

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim, Rosaceae) has been traditionally used in most European countries for the treatment of inflammatory diseases due to its antipyretic, analgesic, astringent, and anti-rheumatic properties. However, there is little scientific evidence on *F. ulmaria* anti-inflammatory effects regarding its impact on cyclooxygenases enzymatic activity and *in vivo* assessment of anti-inflammatory potential. This study aims to reveal the anti-inflammatory activity of methanolic extracts from the aerial parts (FUA) and roots (FUR) of *F. ulmaria*, both in *in vitro* and *in vivo* conditions.
Materials and methods: The characteristic phenolic compounds in *F. ulmaria* extracts were monitored via high performance thin layer chromatography (HPTLC). The *in vitro* anti-inflammatory activity of *F. ulmaria* extracts was evaluated using cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme assays, and an assay for determining COX-2 gene expression. The *in vivo* anti-inflammatory effect of *F. ulmaria* extracts was determined in two doses (100 and 200 mg/kg b.w.) with hot plate test and carrageenan-induced paw edema test in rats. Inflammation was also evaluated by histopathological and immunohistochemical analysis.
Results: FUA extract showed the presence of rutoside, spiraeoside, and isoquercitrin. Both *F. ulmaria* extracts at a concentration of 50 μg/mL were able to inhibit COX-1 and -2 enzyme activities, whereby FUA extract (62.84% and 46.43% inhibition, respectively) was double as effective as the root extract (32.11% and 20.20%, respectively). Extracts hardly inhibited the level of COX-2 gene expression in THP-1 cells at a concentration of 25 μg/mL (10.19% inhibition by FUA and 8.54% by FUR). In the hot plate test, both extracts in two doses (100 and 200 mg/kg b.w.), exhibited an increase in latency time when compared with the control group ($p < 0.05$). In the carrageenan-induced acute inflammation test, FUA at doses of 100 and 200 mg/kg b.w., and FUR at 200 mg/kg, were able to significantly reduce the mean maximal swelling of rat paw until 6 h of treatment. Indomethacin, FUA, and FUR extracts significantly decreased inflammation score and this effect was more pronounced after 24 h, compared to the control group ($p < 0.05$).
Conclusions: The observed results of *in vitro* and, for the first time, *in vivo* anti-inflammatory activity of meadowsweet extracts, provide support of the traditional use of this plant in the treatment of different inflammatory conditions. Further investigation of the anti-inflammatory compounds could reveal the mechanism of anti-inflammatory action of these extracts.

1. Introduction

Filipendula ulmaria (L.) Maxim. (syn. *Spiraea ulmaria* L.), also known as meadowsweet or queen of the meadow, belongs to the Rosaceae family and is found widely in damp meadows trough Europe and Asia (Barros et al., 2011). *F. ulmaria* is used in traditional European medicine for treatment of various ailments due to its antipyretic, diuretic, analgesic, and anti-inflammatory properties

Abbreviations: FUA, *F. ulmaria* aerial part extract; FUR, *F. ulmaria* root extract; COX-1, cyclooxygenase-1; COX-2, cyclooxygenase-2; LOX, lipoxygenase; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; HPTLC, high performance thin layer chromatography; HPLC, high performance liquid chromatography; IL, interleukin; dex, dexamethasone; NFκB, nuclear factor kappa B; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; PAF, platelet-activating factor; PPAR α and γ, peroxisome proliferator-activated receptors

* Corresponding author.
E-mail address: jkatanic@kg.ac.rs (J. Katanić).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.015
Received 28 June 2016; Received in revised form 30 September 2016; Accepted 5 October 2016
Available online 06 October 2016
0378-8741/ © 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Journal of Ethnopharmacology 198 (2017) 608–609

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jep

Corrigendum

Corrigendum to: "*In vitro* and *in vivo* assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent", Journal of Ethnopharmacology 193 (2016) 627–636

Jelena Katanić[a,*], Tatjana Boroja[a], Vladimir Mihailović[a], Stefanie Nikles[b], San-Po Pan[b], Gvozden Rosić[c], Dragica Selaković[c], Jovana Joksimović[c], Slobodanka Mitrović[d], Rudolf 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, Pharmacognosy, University of Graz, Universitaetsplatz 4, 8010 Graz, Austria*
[c] *Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia*
[d] *Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia*

The authors regret that Fig. 6 in our manuscript was incorrect. Due to a procedural error in the manuscript compilation, two of our photographs (II-6 and V-6) in Fig. 6 were mistakenly placed in our accepted paper. We accidentally put the same pictures for the different treatment of carrageenan-induces paw edema in rats (immunohistochemical analysis of tissue samples). This figure should be replaced with a revised one, as follows:

The figure legend and explanation remain the same.

The authors would like to apologize for any inconvenience caused.

DOI of original article: 10.1016/j.jep.2016.10.015.

DOI of original article: http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.015
* Corresponding author.
E-mail address: jkatanic@kg.ac.rs (J. Katanić).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.012

Available online 09 February 2017
0378-8741/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Food and Chemical Toxicology 99 (2017) 86–102

Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Filipendula ulmaria extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: *In vivo* investigation and LC-MS analysis

Jelena Katanić [a, *], Sanja Matić [b], Eva-Maria Pferschy-Wenzig [c], Nadine Kretschmer [c], Tatjana Boroja [a], Vladimir Mihailović [a], Vesna Stanković [d], Nevena Stanković [a], Milan Mladenović [a], Snežana Stanić [b], Mirjana Mihailović [e], Rudolf Bauer [c]

[a] Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[b] Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia
[c] Institute of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacognosy, University of Graz, Universitaetsplatz 4, 8010 Graz, Austria
[d] Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia
[e] Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Bulevar despota Stefana 142, 11060 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 July 2016
Received in revised form
22 October 2016
Accepted 17 November 2016
Available online 18 November 2016

Keywords:
Filipendula ulmaria
LC-DAD-MS^n analysis
Cisplatin
Oxidative stress
Genotoxicity
Cytotoxicity

ABSTRACT

Filipendula ulmaria, known as meadowsweet, is a perennial herb found in wild and cultivated habitats in Europe and Asia. Usage of *F. ulmaria* in traditional medicine is based on diuretic, astringent, antirheumatic, and anti-inflammatory properties of this plant. Exposure to cisplatin at a dose of 7.5 mg/kg caused significant increase in serum parameters of liver and kidneys function and tissue oxidative stress markers along with some histopathological changes in liver and kidney tissues of experimental rats, as well as high level of genotoxicity. Administration of *F. ulmaria* extracts in three different concentrations (100, 200, and 400 mg/kg/day) for 10 days resulted in a reduction of oxidative stress in tissues and decrease of serum parameters. Moreover, tested extracts attenuated the genotoxicity of cisplatin in reverse dose-dependent manner. *F. ulmaria* extracts had no *in vitro* cytotoxic activity at all applied concentrations (IC_{50} > 50 μg/mL). Tested extracts, rich in polyphenolic compounds, attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress, reduce tissue damage, and enhance the antioxidative status of experimental animals during cisplatin application. Therefore, *F. ulmaria* extracts may be used as supportive agent for the prevention and amelioration of cisplatin side effects.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Filipendula ulmaria (L.) Maxim. (Rosaceae), known as meadowsweet, is a perennial herb found in wild and cultivated habitats in Europe and Asia (Barros et al., 2011). Traditionally, the aerial parts and flowers of *F. ulmaria* are considered to have diuretic, antiseptic, antirheumatic, astringent, stomachic, and antacid activities. Dried flowering tops are used for treatment of common cold, minor painful articular conditions, and to facilitate renal and digestive elimination functions (EMA, 2011). Many biological activities of *F. ulmaria* have been reported. A comprehensive overview of the literature indicated that *F. ulmaria* possesses antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and antiproliferative properties (Barros et al., 2011; Harbourne et al., 2013; Katanić et al., 2015a; Trouillas et al., 2003; Vogl et al., 2013). Besides *in vitro* biological activity, the *in vivo* hepatoprotective activity of *F. ulmaria* ethanolic extract and fractions were reported (Shilova et al., 2008, 2006), with the conclusion that the observed hepatoprotective effect of meadowsweet is associated with antioxidant and membrane stabilizing properties.

Cisplatin – *cis*-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ (*cis*-diamminedichlorplatinum(II)) – consists of an atom of platinum surrounded with two ammonia groups and two chlorine atoms in *cis* position. This inorganic complex with a square planar geometry has been in clinical usage for cancer treatments since 1978 when it was approved by the American Food and Drug Administration (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014) and today it is on the World Health Organization's List of Essential Medicines (WHO, 2011). Cisplatin, after

* Corresponding author.
E-mail address: jkatanic@kg.ac.rs (J. Katanić).

http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.018
0278-6915/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Катанић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Фитохемијска и фармаколошка карактеризација одабраних биљних врста рода *Filipendula* Mill. (Rosaceae)

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, 6.6.2017. године,

Јелена Катанић

потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Јелена Катанић,

☑ дозвољавам

☐ не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Фитохемијска и фармаколошка карактеризација одабраних биљних врста рода *Filipendula* Mill. (Rosaceae)

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 дозвољавам[1]

[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 прерада[2]

У Крагујевцу, 6.6.2017. 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/